

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 7 月 25 日 (25.07.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/057443 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12P 21/02 (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都中央区八重洲 2 丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00378
- (22) 国際出願日: 2002 年 1 月 21 日 (21.01.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-13027 2001 年 1 月 22 日 (22.01.2001) JP
特願2001-147759 2001 年 5 月 17 日 (17.05.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山田 隆央 (YAMADA, Takao) [JP/JP]; 〒580-0003 大阪府松原市一津屋 4 丁目 3 番 2 6 号 Osaka (JP). 末永 正人 (SUENAGA, Masato) [JP/JP]; 〒743-0075 山口県光市室積沖田 3-1-32 Yamaguchi (JP). 西村 紀 (NISHIMURA, Osamu) [JP/JP]; 〒666-0112 兵庫県川西市大和西 1 丁目 5 4 番地の 1 6 Hyogo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING ZAQ LIGAND

(54) 発明の名称: ZAQ リガンドの製造方法

(57) Abstract: A process for obtaining a protein having the same activity as that of a ZAQ ligand isolated from eucaryotic cells which comprises efficiently restoring an inactive ZAQ ligand produced in procaryotic cells by using a gene manipulation technique. Namely, a process for producing an active ZAQ ligand characterized by comprising genetic engineeringly expressing a ZAQ ligand in a procaryotic host and then refolding it in a redox buffer.

(57) 要約:

遺伝子操作技術を用いて、原核細胞で生産した不活性な ZAQ リガンドを、効率的に活性を回復させ、真核細胞から単離された ZAQ リガンドと同じ活性を有するタンパク質を得る方法を提供する。

ZAQ リガンドを遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型の ZAQ リガンドの製造方法。

明細書

Z A Q リガンドの製造方法

技術分野

- 5 本発明は、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩（以下、単に「Z A Q リガンド」と称する場合がある。また、「配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチド」を単に「Z A Q リガンド」と称する場合もある。）を、遺伝子操作技術を用いて原核細胞中で発現させ、抽出した Z A Q リガンドにリフォールディング操作を行い、薬理的に活性な Z A Q リガンドを製造する方法などに関する。
- 10

15 背景技術

- 分子内に多くのシステイン残基を含み、ジスルフィド結合を有するタンパク質またはペプチドを、公知の遺伝子工学的手法により、チャイニーズハムスター細胞（例、CHO）、サル細胞（例、COS-7）等の真核細胞を宿主として発現すると薬理的に活性なタンパク質またはペプチドが得られる。しかし、該タンパク質またはペプチドを真核細胞により発現させる方法は、原核細胞により発現させる方法に比べ、一般的に、目的とするタンパク質またはペプチドの発現量が低く、さらに真核細胞用の培地が高価であるため、該タンパク質またはペプチドの工業的規模での製造には適していない。
- 20

- 一方、レドックスバッファーを用いて目的のタンパク質を製造する方法としては、特表開 62-502895、特開平 10-191989 公報などで報告されている。
- 25

Z A Q リガンドはオーファンレセプターであった Z A Q レセプター（配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩）に対してリガンド活性を有するペプチドで、消化

器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）などの予防・治療作用を有する有用なペプチドである。該ペプチドは、公知の遺伝子工学的手法により、真核細胞を用いて製造することができる。

しかし、Z A Qリガンドをチャイニーズハムスター細胞（例、CHO）、サル
5 細胞（例、COS-7）等の真核細胞を宿主として発現すると薬理的に活性なZ A Qリガンドが得られるものの、真核細胞用の培地は高価であり、さらにタンパク質の発現量が低く、工業的規模での製造は適当とはいえない。

一方、原核細胞を用いると大量のタンパク質を発現させることができるが、薬理的に活性が不十分な封入体を形成してしまう。Z A Qリガンドの一例である配
10 列番号：21で表されるアミノ酸配列からなるペプチドは、分子内に10個のシステイン残基を含み、5組のジスルフィド結合を有している。従って、原核細胞を用いてZ A Qリガンドを生産すると、封入体が形成されてしまい、該封入体に存在するZ A Qリガンドを効率よく活性型Z A Qリガンドに変換することは従来
15 の方法では困難であった。そこで、薬理的に活性なZ A Qリガンドの工業的に有利な製造方法（大量製造方法等）が求められていた。

発明の開示

本発明者らは、これらの課題を解決すべく、原核細胞の高生産性を利用することにより、効率的なZ A Qリガンドの活性化方法（再生方法）を提供すべく鋭意
20 研究を重ねた結果、遺伝子操作技術を用いてZ A Qリガンドを原核細胞において発現後、活性化する工程において、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを初めて試みた。その結果、予想外にもZ A Qリガンドの活性化が工業的に効率よく行うことができることを見出し、更に研究を行った結果、本発明を完成したものである。

25 即ち、本発明は、遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させたZ A Qリガンドをレドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型Z A Qリガンドの製造方法に関するものである。

具体的には、本発明は、

（1）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミ

ノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一

- 5 一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有する活性型のペプチドまたはその塩の製造方法、

- (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：21
10 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である上記(1)記載の製造方法、

- (3) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：21
15 で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である上記(1)記載の製造方法、

- (4) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：19
20 で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である上記(1)記載の製造方法、

- (5) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：30
25 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である上記(1)記載の製造方法、

- (6) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質ま

たはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である上記（1）記載の製造方法、

- （7）配列番号：21または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型の該ペプチドまたはその塩の製造方法、

- （8）配列番号：21、配列番号：19または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型のペプチドまたはその塩の製造方法、

（9）レドックスバッファーが還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを含有する緩衝液である上記（1）記載の製造方法、

- （10）レドックスバッファー中の還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの濃度が、それぞれ約0.01～100ミリモル／リットルである上記（9）記載の製造方法、

（11）緩衝液がトリス緩衝液である上記（8）記載の製造方法、

（12）レドックスバッファーのpHが7から9の範囲である上記（1）記載の製造方法、

- （13）レドックスバッファーのpHが約8である上記（1）記載の製造方法、

（14）レドックスバッファーが、メルカプト基を有さないアミノ酸を、さらに含有する上記（1）記載の製造方法、

（15）メルカプト基を有さないアミノ酸がアルギニンである上記（14）記載の製造方法、

- （16）メルカプト基を有さないアミノ酸のレドックスバッファー中の濃度が約0.1～1モル／リットルである上記（14）記載の製造方法、

（17）0～30℃下でリフォールディングする上記（1）記載の製造方法、

（18）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質

またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を可溶化し、ついでレドックスバッファー中でリフォールディングする上記（１）記載の製造方法、

- （１９）配列番号：２１または配列番号：３０で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を可溶化し、ついでレドックスバッファー中でリフォールディングする上記（７）記載の製造方法、

（２０）還元剤非存在下で可溶化する上記（１８）または（１９）記載の製造方法、

- （２１）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、細胞を変性剤で可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸をさらに含有するpH 7～9のレドックスバッファーで、変性剤を不作用濃度まで希釈することを特徴とする上記（１）記載の製造方法、

- （２２）配列番号：２１または配列番号：３０で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を変性剤で可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸をさらに含有するpH 7～9のレドックスバッファーで、変性剤を不作用濃度まで希釈することを特徴とする上記（７）記載の製造方法、

（２３）変性剤がグアニジンまたは尿素である上記（２１）または（２２）記載の製造方法、

- （２４）希釈液中の変性剤の濃度が、約０～２モル／リットルになるまで、レドックスバッファーで希釈する上記（２１）または（２２）記載の製造方法、

（２５）配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、形成された封入体に存在する該ペプチドまたはその

塩を、レドックスバッファー中でリフォールディングする上記（１）記載の製造方法、

（２６）ペプチドが、配列番号：２１または配列番号：３０で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである上記

５ （２５）記載の製造方法、

（２７）配列番号：２１または配列番号：３０で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に発現させた原核細胞宿主を、変性剤で可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸、還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを含有する緩衝液と反応させる活性型の該ペプチドまたはその塩の製造方法などに関するものである。

10

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、Z A Qリガンドを遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型のZ A Qリガンドの製造方法である。好ましくは、Z A Qリガンドを遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を可溶化することにより不活性化されたZ A Qリガンドを、レドックスバッファー中でリフォールディングすることにより、活性型のZ A Qリガンドを製造する。

15

本発明で用いられるZ A Qリガンドとしては、配列番号：１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩（以下、「Z A Qレセプター」と略記することがある）と結合する能力を有するペプチドまたはその塩、またはZ A Qレセプターを活性化する能力を有するペプチドまたはその塩である。

20

Z A Qリガンドとして好ましくは、（１）配列番号：２１で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、Z A Qレセプターと結合するまたはZ A Qレセプターを活性化する能力を有するペプチドまたはその塩、（２）配列番号：１９で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、Z A Qレセプターと結合するまたはZ A Qレセプター

25

を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩、(2) 配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、Z A Qレセプターと結合するまたはZ A Qレセプターを活性化する能力を有するペプチドまたはその塩などである。

- 5 Z A QリガンドのZ A Qレセプターと結合するまたはZ A Qレセプターを活性化する能力は、公知のリガンド・レセプター結合活性を測定する方法またはそれに準じた方法や公知の細胞刺激活性（細胞内C a イオン濃度変化（例、後述の実施例1-6に記載の方法など）、c A M P合成抑制活性など）またはそれに準じた方法により測定することができる。
- 10 本発明の方法で製造されるZ A Qリガンドは、Z A Qレセプターと結合する能力を有するペプチドもしくはZ A Qレセプターを活性化する能力を有するペプチド（以下、「活性型のペプチド」と略記することができる）またはその塩である。具体的には、(1) 活性型の配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩、(2) 活
- 15 性型の配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である。

Z A Qレセプター（Gタンパク質共役型レセプタータンパク質）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプタータンパク質である（WO 01/16309）。

- 20 Z A QリガンドおよびZ A Qレセプターは、例えば、ヒトや非ヒト哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、
- 25 T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、M E L, M 1, C T L L - 2, H T - 2, W E H I - 3, H L - 6 0, J O S K - 1, K 5 6 2, M L - 1, M O L T -

3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来するペプチド・タンパク質であってもよく、また合成ペプチド・合成タンパク質であってもよい。

配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：21で表されるアミノ酸配列と約60%以上（好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の性質を有するペプチドなどが好ましい。

配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：19で表されるアミノ酸配列と約60%以上（好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の性質を有するペプチドなどが好ましい。

- 配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：30で表されるアミノ酸配列と約60%以上（好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、より好ましくは約85%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上）の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。
- 5

配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドとしては、例えば、配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の性質を有するペプチドなどが好ましい。

- 10 ZAQリガンドの好ましい具体例は、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチド、配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドなどである。

- 実質的に同質の活性としては、例えば、ZAQレセプターに対する結合活性、
- 15 ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、ZAQレセプターに対する結合活性、ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用などの活性が同等（例、約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

- 20 これらの活性の測定は、公知の方法またはそれに準じた方法によって行なうことができる（具体的には、後述の実施例1～6に記載の方法またはそれに準じた方法等）。

- また、ZAQリガンドとしては、①配列番号：19または配列番号：21で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より
- 25 好ましくは1～20個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：19または配列番号：21で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～40個程度、より好ましくは1～30個程度、なかでも好ましくは1～20個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：19または配列番号：21で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～

- 30個程度、より好ましくは1～20個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用いられる。さらに、①配列番号：30で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～20個程度)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：30で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1～40個程度、より好ましくは1～30個程度、なかでも好ましくは1～20個程度)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：30で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～20個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するペプチドなども用いられる。

- ZAQレセプターをコードする配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

- 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質などが好ましい。
- 20 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(ZAQレセプター)としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

- 25 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約0.5～2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができる。

また、Z A Qレセプターとしては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10
5 個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より
10 好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などもその具体例としてあげることができる。

本明細書におけるペプチドおよびタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。Z A
15 Qリガンド、Z A Qレセプターをはじめとする本発明のペプチドおよびタンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{5-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -
20 ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

25 本明細書におけるペプチドおよびタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本明細書におけるペプチドおよびタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本明細書におけるペプチドおよびタンパク質には、上記したペプチド・タンパク質において、N末端アミノ酸のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチド・糖タンパク質などの複合ペプチド・複合タンパク質なども含まれる。

- 5
10 ZAQリガンドの好ましい具体例としては、例えば、配列番号：19、配列番号：21または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のペプチドなどがあげられる。

 ZAQレセプターの好ましい具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）のタンパク質などがあげられる。

15

 ZAQリガンドまたはZAQレセプターの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩や水和物などが用いられる。

20

 本発明で用いられる原核細胞としては、*Escherichia coli*（大腸菌）等のエシエリヒア属菌、*Bacillus subtilis*（枯草菌）等のバチルス属菌、*Serratia marcescens*（セラチア）等のセラチア属菌等が挙げられ、中でも*Escherichia coli*等が好ましい。これらの原核細胞の形質転換、培養等は次に示す方法のほか、常法（特開平3-204897号に記載の方法など）またはそれに準じた方法によって行うこともできる。

25

 ZAQリガンドをコードするDNAとしては、前述したZAQリガンドをコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。また、ゲ

ノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より

5 total RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、ZAQリガンドをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：20で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：20で

10 表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性(例、ZAQレセプターに対する結合活性、ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用など)を有するペプチドをコードするDNA、(2) 配列番号：22で表わされる塩基配列を含有するDNA、ま

15 たは配列番号：22で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、配列番号：21で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性(例、ZAQレセプターに対する結合活性、ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用など)を有するペプチドをコードするDNA、(3) 配列番号：31で表わされる塩基配列を

20 含有するDNA、または配列番号：31で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性(例、ZAQレセプターに対する結合活性、ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用など)を有するペプチドをコードするDNAであれば何れのものでもよ

25 い。

配列番号：20で表わされる塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：16で表わされる塩基配列を含有するDNA等が挙げられる。

配列番号：22で表わされる塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNA等が挙げられる。

配列番号：31で表わされる塩基配列を含有するDNAとしては、配列番号：41で表わされる塩基配列を含有するDNA等が挙げられる。配列番号：20、配列番号：22または配列番号：31で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配
5 列番号：20、配列番号：22または配列番号：31で表わされる塩基配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号：22で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとして、具体的には、配列番号：38で
10 表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：38で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを含有し、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、ZAQレセプターに対する結合活性、ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするDNA等が
15 挙げられる。

配列番号：31で表わされる塩基配列を含有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとして、具体的には、配列番号：39で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：39で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDN
20 Aを含有し、配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドと実質的に同質の活性（例、ZAQレセプターに対する結合活性、ZAQレセプターを介するシグナル情報伝達作用など）を有するペプチドをコードするDNA等が挙げられる。

具体的には、（1）配列番号：19で表されるアミノ酸配列を含有するペプチ
25 ドをコードするDNAとしては、配列番号：20で表される塩基配列を含有するDNAが、（2）配列番号：21で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：22または配列番号38で表される塩基配列を含有するDNAが、（3）配列番号：30で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：31または配列番号39

で表される塩基配列を含有するDNAがそれぞれ挙げられる。

上記のZ A QリガンドをコードするDNAは、(1)全塩基配列を公知の方法またはそれに準じた方法により化学的に合成してもよいし、(2)Z A QリガンドをコードするDNAの塩基配列などを参考にして、ポリメラーゼ・チェーン・リ

- 5 アクション (Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する) 法によって増幅し取得してもよい。

- Z A QリガンドをコードするDNAを導入するプラスミドとしては、たとえば大腸菌由来のp B R 3 2 2 [ジーン (Gene)、2巻、95頁(1977年)]、p B R 3 2 5 [ジーン、4巻、121頁(1978年)]、p U C 1 2 [ジーン、19巻、259頁(1982年)]、p U C 1 3 [ジーン、19巻、259頁(1982年)]、枯草菌由来のp U B 1 1 0 [バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications)、112巻、678頁(1983年)]などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いずれを用いることもできる。またDNAを組み込むファージベクターとしては、たとえばλ g t 1 1 [ヤング及びデーヴィス (Young, R. and Davis, R.)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.)、80巻、1194頁(1983年)]などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであれば用いることができる。
- 10
15
20

- プラスミドに組み込む方法としては、たとえば、ティー・マニアティス (T. Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、239頁(1982年)に記載の方法などが挙げられる。またファージベクターにDNAを組み込む方法としては、たとえばヒューン (Hyunh, T. V.) らの方法 [ディー・エヌ・エー・クローニング、ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning, A Practical Approach) 1巻、49頁(1985年)]などが挙げられる。
- 25

このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリヒア (Escherichia) 属菌、バチルス (Bacillus) 属菌などに導入される。

- 上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12DH1 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 60巻、160頁 (1968年)]、JM103 [ヌクレイック・アシッズ・リサーチ (Nucleic Acids Research) 9巻、309頁 (1981年)]、JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology) 120巻、517頁 (1978年)]、HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459頁 (1969年)]、C600 [ジェネティックス (Genetics) 39巻、440頁 (1954年)]、MM294 [ネイチャー (Nature) 217巻、1110頁 (1968年)] などが挙げられる。

上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン、24巻、255頁 (1983年)]、207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) 95巻、87頁 (1984年)] などが挙げられる。

- 15 プラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばティー・マニアティス (T. Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、249頁 (1982年) に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法などが挙げられる。

- 20 またファージ・ベクターを用いる場合には、たとえば増殖させた大腸菌にインビトロパッケージング法を用いて導入することができる。

このようにしてクローン化されたZAQリガンドをコードするDNAは必要があればプラスミド、例えばpBR322、pUC12、pUC13、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119などにサブクローニングして用いることができる。

- 25 このようにして得られたZAQリガンドをコードするDNAの塩基配列を、たとえばマキサム・ギルバート (Maxam-Gilbert) 法 (Maxam, A. M. and Gilbert, W., プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.)、74

巻、560頁(1977年)]あるいはジデオキシ法[Messing, J.ら、ヌクレイック・アシッズ・リサーチ(Nucleic Acids Research)9巻、309頁(1981年)]によって決定し、既知のアミノ酸配列との比較からZ A QリガンドをコードするDNAの存在を確認できる。

- 5 上記のようにしてクローン化されたZ A QリガンドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素やエキソヌクレアーゼで消化して使用することが出来る。

次に、クローン化されたZ A QリガンドをコードするDNAから発現させたい領域を切り出し、発現に適したベクター(ベクター)中のプロモーターの下流に

- 10 連結して発現型ベクターを得ることができる。

該DNAはその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロ

- 15 モーターを接続する。

ベクターとしては、上記の大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 枯草菌由来プラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)などが挙げられる。

- 20 本発明で用いられるプロモーターとしては、DNAの発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

- 形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、T7プロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリヒア属菌でプロモーターがT7プロモーター、trp
- 25 pプロモーターまたはλPLプロモーターであることが好ましい。

なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。

このようにして構築されたZ A QリガンドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、原核細胞の形質転換体を製造する。

上記エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、69巻、2110頁(1972年)やジーン (Gene)、17巻、107頁(1982年)などに記載の方法に従って行なわれる。

- 5 バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics)、168巻、111頁(1979年)などに記載の方法に従って行われる。

- このようにして、Z A QリガンドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された原核細胞の形質転換体を得られる。宿主としてエシェリヒア属
10 菌を、プロモーターとしてT7プロモーターを用いる場合、T7プロモーターの発現効率の向上を目的として、Z A QリガンドをコードするDNAを含有する発現ベクターに加え、T7リゾチーム発現プラスミドを共存させてもよい。

- 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生
15 育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、
20 無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller)、ジャーナル・オブ・エクスぺリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Ge
25 netics)、431-433頁、Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕、LB培地等が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえばイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間

行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- ZAQリガンドが宿主原核細胞中で不溶成分（封入体）を形成する場合には、
- 5 培養後、遠心分離等の方法により集菌した後、細胞を破碎し、封入体を変性剤を用いて可溶化することによって、ZAQリガンドを抽出することができる。

- 細胞の破碎は、常法で、たとえば超音波処理により実施できる。懸濁媒体として中性付近のpH値（pH6.5～7.5）に調整した好適な緩衝液（例えばリン酸緩衝液等）を用いることが好ましい。この際、細胞の破碎を促進させるため
- 10 EDTAを添加してもよい。このようにして細胞を破碎した後に、不溶成分（封入体）を任意の方法で、遠心分離するか、濾過することにより分取する。原核細胞由来のタンパク質をできる限り除去するため、たとえば水、リン酸緩衝液を用いて洗浄することが好ましいが、場合により4M程度の尿素で洗浄してもよい。

- 得られた沈殿（ペレット）を変性剤を用いて可溶化する際の変性剤としては、
- 15 公知の変性剤、特にグアニジンまたは尿素等を使用することができる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは4～8モル／リットル、好ましくは約6～7モル／リットル、尿素では5～9モル／リットル、好ましくは約8モル／リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

- 20 ZAQリガンドが宿主原核細胞中で封入体を形成しない場合には、培養後、遠心分離等の方法により集菌した後、細胞を変性剤を用いて可溶化するか、あるいは細胞を破碎後変性剤で可溶化することによってZAQリガンドを抽出することができる。

- 集菌した細胞の可溶化に用いられる変性剤としては、例えばグアニジンまたは
- 25 尿素などが挙げられる。変性剤は通常水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは通常4～8モル／リットル、好ましくは約6～7モル／リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

細胞の破碎は、常法で、たとえば超音波処理、フレンチ・プレスにより実施で

きる。破碎された細胞の可溶化に用いられる変性剤としては、公知の変性剤を使用してよく、好ましくは、グアニジンまたは尿素などを使用する。変性剤は通常、水溶液として用いられ、水溶液中の変性剤の濃度は、グアニジンでは4～8モル/リットル、好ましくは約6～7モル/リットル、尿素では5～9モル/リットル、好ましくは約8モル/リットルである。グアニジンは通常グアニジン塩酸塩等のグアニジンの酸付加塩として用いられる。

上記のようにして封入体の可溶化を行うか、菌体を変性剤で直接可溶化するか、または細胞を破碎後変性剤で可溶化した後、遠心分離等で不純物を除去し、得られた上澄液を必要により精製工程に付した後、Z A Qリガンドのリフォールディング（活性化、再生化）を行う。

リフォールディングは、精製したZ A Qリガンドにレドックスバッファーを添加するか、またはZ A Qリガンドを含有する上澄液をレドックスバッファーで希釈することにより行われる。

レドックスバッファーとしては、酸化型グルタチオン（G S S G）および還元型グルタチオン（G S H）を含有する緩衝液、システインおよびシスチンを含有する緩衝液、システアミンおよびシスタミンを含有する緩衝液などが挙げられる。中でもG S S GおよびG S Hを含有する緩衝液が好ましい。上記緩衝液としては、例えば、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液等が挙げられ、中でもトリス緩衝液等が好ましい。

レドックスバッファー中の酸化剤（酸化型物質）および還元剤（還元型物質）の濃度は、例えば、それぞれ0.01～100ミリモル/リットルおよび0.01～100ミリモル/リットルである。より具体的には、G S S GおよびG S Hを用いる場合、レドックスバッファー中のG S S Gの濃度は0.01～100ミリモル/リットル、好ましくは0.1～10ミリモル/リットル、好ましくは0.1～1.0ミリモル/リットルが用いられ、G S Hの濃度は0.01～100ミリモル/リットル、好ましくは0.1～10ミリモル/リットル、好ましくは0.2～2.0ミリモル/リットルが用いられる。

この際、たとえばメルカプト基を有さないアミノ酸などをレドックスバッファーにさらに含有させておくことが好ましい。Z A Qリガンドを含有する上澄液を

21

レドックスバッファーで希釈する場合、変性剤の濃度を活性化に適した中性 pH において不作用濃度まで希釈することが好ましい。たとえば変性剤としてグアニジンを使用する場合、希釈液中のグアニジンの濃度を 0～2.0 モル/リットル、好ましくは約 1 モル/リットル以下まで、変性剤として尿素を使用する場合、
5 希釈液中の尿素の濃度を 0～4.0 モル/リットル、好ましくは約 2 モル/リットル以下まで希釈することが望ましい。

上記メルカプト基を有さないアミノ酸としては、本発明の目的が達成される限り、メルカプト基を有さないアミノ酸であればいずれのものでもよいが、アルギニン、アスパラギン酸、バリン、リジン、アラニン、シトルリン等が挙げられる
10 。アルギニン等が Z A Q リガンド類のリフォールディングにおける収率の点で好ましい。レドックスバッファー中の該アミノ酸の添加濃度は、0.1～1.0 モル/リットル、好ましくは 0.2～0.8 モル/リットルである。

上記リフォールディングに当たっての温度は 0～30℃、好ましくは 4～15℃である。pH は 7～9、好ましくは pH 7.5～8.5 である。リフォールディングに要する時間は通常 0.5～7 日間、好ましくは 1～3 日間、さらに好ましくは 1～2 日間である。
15

なお、可溶化後かつリフォールディングの前に、例えば抽出、塩析、透析、分配、結晶化、再結晶、ゲルろ過、クロマトグラフィー等の公知で常用の精製工程を導入することができ、好ましくは、たとえば 0.1 モル/リットル リン酸緩衝液中セファデックス (Sephadex) G-25 (アマシャム ファルマシア バイオテク (株)) にかけることにより精製することができる。変性剤の分離は場合により 0.1 モル/リットル リン酸緩衝液に対して透析することによっても可能である。
20

精製工程はリフォールディングに続いて行うこともできる。一般にそのような精製としては例えば抽出、塩析、透析、分配、結晶化、再結晶、ゲルろ過、クロマトグラフィー等が挙げられ、好ましい例として透析や、たとえば SP-セファロース (アマシャム ファルマシア バイオテク (株))、CM-5PW (トーソー (株)) あるいは、DEAE-5PW (トーソー (株)) を介したイオン交換クロマトグラフィー、たとえば C4P-50 (昭和電工 (株)) を用いた逆相
25

クロマトグラフィー等による精製法が挙げられる。

本発明で得られるZ A Qリガンド（活性型Z A Qリガンド）は、真核細胞から得られるZ A Qリガンドと同様の作用を有しており、真核細胞から得られるZ A Qリガンドの使用法と同様にして用いることができる。

- 5 即ち、Z A Qリガンドは腸管の収縮などを制御する活性を有し、Z A QリガンドをコードするDNA等が欠損している場合あるいは発現量が異常に減少している場合、例えば、消化器疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）等、種々の疾病が発症する。

- したがって、本発明の製造方法で得られるZ A Qリガンドは、例えば、消化器
10 疾患（例えば腸炎、下痢、便秘、吸収不良性症候群など）等、種々の疾病の治療・予防剤等の医薬として使用することができる。

- 例えば、生体内においてZ A Qリガンドが減少あるいは欠損しているために、Z A Qレセプターが発現している細胞における情報伝達が十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、Z A Qリガンドを該患者に投与すること等によ
15 って、該患者におけるZ A Qリガンドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

Z A Qリガンドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

- 20 Z A Qリガンドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤等の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、Z A Qリガンドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等とともに一般に認められた
25 製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤等に混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロ

- ースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸等のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤等が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに
- 5 油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油等のような天然産出植物油等を溶解または懸濁させる等の通常の製剤実施に従って処方することができる。

- 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等
- 10 ）等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50等）等と併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油等が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等と併用してもよい。
- 15 い。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液等）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコール等）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノール等）、酸化防止剤等と配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

- 20 このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えばヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル等）に対して投与することができる。

- ZAQリガンドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルート等により差異はあるが、例えば、消化器疾患の治療目的でZAQリガンドを経口投与する場合、
- 25 一般的に成人（60kgとして）においては、一日につきZAQリガンドを約1mg～1000mg、好ましくは約10～500mg、より好ましくは約10～200mg投与する。非経口的に投与する場合は、ZAQリガンドのペプチドの1回投与量は投与対象、対象疾患等によっても異なるが、例えば、消化器疾患の治療目的でZAQリガンドを注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与す

る場合、一日につきZ A Qリガンドを約1～1000mg程度、好ましくは約1～200mg程度、より好ましくは約10～100mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 5 本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。また、アミノ酸に関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

10 DNA : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

15 RNA : リボ核酸

mRNA : 伝令リボ核酸

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

DTT : ジチオスレイトール

20 Gly (G) : グリシン

Ala (A) : アラニン

Val (V) : バリン

Leu (L) : ロイシン

Ile (I) : イソロイシン

25 Ser (S) : セリン

Thr (T) : スレオニン

Cys (C) : システイン

Met (M) : メチオニン

Glu (E) : グルタミン酸

- A s p (D) : アスパラギン酸
L y s (K) : リジン
A r g (R) : アルギニン
H i s (H) : ヒスチジン
5 P h e (F) : フェニルアラニン
T y r (Y) : チロシン
T r p (W) : トリプトファン
P r o (P) : プロリン
A s n (N) : アスパラギン
10 G l n (Q) : グルタミン
A s x : A s p + A s n
G l x : G l u + G l n

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

- 15 [配列番号：1]
Z A Q レセプターのアミノ酸配列を示す。
[配列番号：2]
Z A Q レセプターをコードするDNAの塩基配列を示す (Z A Q C)。
[配列番号：3]
20 Z A Q レセプターをコードするDNAの塩基配列を示す (Z A Q T)。
[配列番号：4]
参考例1で用いられたプライマー Z A Q C S a l の塩基配列を示す。
[配列番号：5]
参考例1で用いられたプライマー Z A Q C S p e の塩基配列を示す。
25 [配列番号：6]
参考例2で精製されたZ A Q 活性化ペプチドのN末端のアミノ酸配列を示す。
[配列番号：7]
参考例3で用いられたプライマー Z F 1 の塩基配列を示す。
[配列番号：8]

参考例 3 で用いられたプライマー Z F 2 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 9]

参考例 3 で用いられたプライマー Z F 3 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 10]

- 5 参考例 3 で得られたヒト型 Z A Q リガンドペプチドをコードする DNA の 3' 端塩基配列を示す。

[配列番号 : 11]

参考例 3 で用いられたプライマー Z A Q L - C F の塩基配列を示す。

[配列番号 : 12]

- 10 参考例 3 で用いられたプライマー Z A Q L - X R 1 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 13]

参考 4 で得られた DNA 断片の塩基配列を示す。

[配列番号 : 14]

参考例 4 で得られた DNA 断片の塩基配列を示す。

- 15 [配列番号 : 15]

ヒト型 Z A Q リガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 16]

配列番号 : 15 で表わされるヒト型 Z A Q リガンド前駆体ペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

- 20 [配列番号 : 17]

ヒト型 Z A Q リガンド前駆体ペプチドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 18]

配列番号 : 17 で表わされるヒト型 Z A Q リガンド前駆体ペプチドをコードする DNA の塩基配列を示す。

- 25 [配列番号 : 19]

ヒト型 Z A Q リガンドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 20]

配列番号 : 19 で表わされるヒト型 Z A Q リガンドをコードする cDNA の塩基配列を示す。

[配列番号：21]

ヒト型Z A Qリガンドのアミノ酸配列を示す。

[配列番号：22]

配列番号：21で表わされるヒト型Z A Qリガンドをコードするc DNAの塩

5 基配列を示す。

[配列番号：23]

参考例4(4-1)で用いられたDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：24]

実施例1で用いられたDNA断片#1の塩基配列を示す。

10 [配列番号：25]

実施例1で用いられたDNA断片#2の塩基配列を示す。

[配列番号：26]

実施例1で用いられたDNA断片#3の塩基配列を示す。

[配列番号：27]

15 実施例1で用いられたDNA断片#4の塩基配列を示す。

[配列番号：28]

実施例1で用いられたDNA断片#5の塩基配列を示す。

[配列番号：29]

実施例1で用いられたDNA断片#6の塩基配列を示す。

20 [配列番号：30]

ヒト型B v 8のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：31]

配列番号：30で表わされるヒト型B v 8をコードするc DNAの塩基配列を示す。

25 [配列番号：32]

実施例2-1で用いられたDNA断片#1の塩基配列を示す。

[配列番号：33]

実施例2-1で用いられたDNA断片#2の塩基配列を示す。

[配列番号：34]

実施例 2-1 で用いられた DNA 断片 # 3 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 35]

実施例 2-1 で用いられた DNA 断片 # 4 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 36]

5 実施例 2-1 で用いられた DNA 断片 # 5 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 37]

実施例 2-1 で用いられた DNA 断片 # 6 の塩基配列を示す。

[配列番号 : 38]

10 配列番号 : 21 で表わされる ヒト型 ZAQ リガンド をコードする 合成 DNA の
塩基配列を示す。

[配列番号 : 39]

配列番号 : 30 で表わされる ヒト型 Bv8 をコードする 合成 DNA の塩基配列
を示す。

[配列番号 : 40]

15 ヒト型 Bv8 前駆体 ペプチド のアミノ酸配列を示す。

[配列番号 : 41]

ヒト型 Bv8 前駆体 ペプチド をコードする DNA の塩基配列を示す。

後述の参考例 1 で得られた形質転換体 *Escherichia coli*
20) DH5 α /pCR2.1-ZAQC は、平成 11 (1999) 年 8 月 23 日か
ら、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-85
66) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産
業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) に寄託番号 FERM
BP-6855 として、平成 11 (1999) 年 8 月 4 日から、日本国大阪府
25 大阪市淀川区十三本町 2-17-85 財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託
番号 IFO 16301 として寄託されている。

後述の参考例 1 で得られた形質転換体 *Escherichia coli*
) DH5 α /pCR2.1-ZAQT は、平成 11 (1999) 年 8 月 23 日
から日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-85

66) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-6856として、平成11(1999)年8月4日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16302として寄託されている。

後述の参考例3で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pHMITAは、平成12(2000)年7月13日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7219として、平成12(2000)年5月26日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16440として寄託されている。

後述の参考例3で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pHMITGは、平成12(2000)年7月13日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7220として、平成12(2000)年5月26日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16441として寄託されている。

後述の実施例1で取得されたエシェリヒア コリ (Escherichia coli) MM294 (DE3) /pTCh1ZAQは、平成13(2001)年4月27日から、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省 工業技術院 生命工学工業技術研究所 (NIBH)) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7571として、平成13(2001)年1月16日から受託番号IFO 16527として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託されている。

後述の実施例2で取得されたエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) MM294 (DE3) / pTCh2ZAQは、平成13(2001)年4月27日から日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(旧 通商産業省
5 工業技術院 生命工学工業技術研究所(NIBH))独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7572として、平成13(2001)年3月15日から受託番号IFO 16587として財団法人発酵研究所(IFO)に寄託されている。

10 実施例

以下の参考例および実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

15 参考例1 ZAQレセプターをコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト脳下垂体cDNA(CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(5'-GTC GAC ATG GAG ACC ACC ATG GGG TTC ATG G-3'; 配列番号: 4)及びプライマー2(5'-ACT AGT TTA TTT TAG TCT GAT GCA GTC CAC CTC TTC -3'; 配列番号: 5)を用いてPCR反応を行
20 った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix(CLONTECH社)1/50量、プライマー1及びプライマー2を各0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、及び酵素に添付のバッファーを加え、25 μ lの液量とした。PCR反応は、94 $^{\circ}$ C \cdot 2分の後、94 $^{\circ}$ C \cdot 20秒、72 $^{\circ}$ C \cdot 100秒のサイクルを3回、94 $^{\circ}$ C \cdot 20秒、68 $^{\circ}$ C \cdot
25 100秒のサイクルを3回、94 $^{\circ}$ C \cdot 20秒、64 $^{\circ}$ C \cdot 20秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 100秒のサイクルを38回繰り返し、最後に68 $^{\circ}$ C \cdot 7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天

- 培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードする2種類のcDNA配列Z A Q C（配列番号：2）及びZ A Q T（配列番号：3）を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列を有するタンパク質はいずれも同一配列（配列番号：1）を有したためZ A Qと命名し、配列番号：2で表されるDNAを含有する形質転換体を大腸菌（*Escherichia coli*）DH5 α /pCR2.1-ZAQCならびに配列番号：3で表されるDNAを含有する形質転換体を大腸菌DH5 α /pCR2.1-ZAQTと命名した。

参考例2 Z A Qレセプターを活性化するペプチドの単離

10 (2-1) 牛乳抽出液の調製

- 市販の低温殺菌牛乳を用いて、以下の操作を行い抽出液を調製した。牛乳2 literを高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて、10,000 rpm、15分間、4°Cで遠心し、得られた上清をガーゼでろ過し、脂質片を取り除いた。上清に最終濃度1 Mになるように酢酸を加え、4°Cにて30分間攪拌し、次いで
- 15 高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、15分間遠心し上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。上清に攪拌しながら2倍容のアセトンを加え4°Cにて3時間攪拌した。次いで高速遠心機（CR26H、R10A型ローター：日立株式会社）を用いて10,000 rpm、15分間遠心後、得られた上清をガーゼでろ過し不溶物を除去した。得られた上清をロータリーエバポレーターにか
- 20 け、アセトン除去し、最終的に1350 mlまで濃縮した。得られた濃縮液を、675 mlごとに338 mlのジエチルエーテルと混合し、分液ロート中にて激しく混和し、2相分離後、水相を得た。得られた水相について同じ操作をさらに1回繰り返す、清澄な水相を得た。得られた水相を、ロータリーエバポレーターを用いて800 mlまで濃縮し、最終的な抽出液を得た。

25

(2-2) 牛乳抽出液のC18逆相クロマトグラフィーによる粗分画

オクタデシル基を固定したシリカゲルを充填したカラムSep-Pak C18（Waters社）10 gをメタノールで膨潤後、1 M 酢酸で平衡化した。このカラムに、（2-1）で調製した抽出液（牛乳2 liter分）を添着した。続いて、このカラムに、1

00 mlの1 M 酢酸を流しゲルを洗浄した。次に、このカラムに200 mlの60% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸を流し、目的とする粗ペプチド成分を溶出した。得られた溶出液を、エバポレーターを用いて濃縮した後、凍結乾燥機 (12EL ; VirTis社) にて凍結乾燥した。

5

(2-3) 牛乳抽出液のスルホプロピルイオン交換クロマトグラフィーによる粗分画

ポリプロピレン製のカラムに100 mM塩酸中で膨潤させたSP Sephadex C-25 (Amersham Pharmacia Biotech 社) を、容量が2 mlになるよう充填し、蒸留水及び2
10 M ギ酸アンモニウム(pH 4.0)で洗浄した後、I液 (2 M ギ酸アンモニウム : アセトニトリル : 水=1:25:74) で平衡化した。上記 (2-2) で得られた凍結乾燥物をI液20 mlに溶解し、SP Sephadex C-25 2 mlにロードした。I液10 mlで洗浄後、II液 (2 M ギ酸アンモニウム : アセトニトリル : 水=1:2.5:6.5) 、III液 (2 M ギ酸アンモニウム : アセトニトリル : 水=1:1:2) 、IV液 (2 M ギ酸アンモニウム : アセトニトリル : 水=1:0.5:0.5) 各10 mlで順次溶出した。得られたI液からIV液を、それぞれ凍結乾燥機 (12EL ; VirTis社) にて凍結乾燥した。
15

(2-4) 牛乳抽出液のTSKgel ODS80Ts逆相高速液体クロマトグラフィーによる
20 分画

TSKgel ODS-80Ts逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー株式会社、4.6 mm x 25 cm) を、40°Cにて、流速1 ml/minで A液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) 容量81.7%/B液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量8.3%を流し、平衡化した。上記 (2-3) で得られたI液からIV液の凍結乾燥
25 物を、それぞれ1 M 酢酸4 mlに溶解しクロマトグラフィー操作に処した。即ち、凍結乾燥物の溶液4 mlを該カラムに添着した後、流速1 ml/minで、1分間かけてA液容量67%/B液容量33% まで上昇させ、次いで40分間かけてA液容量67%/B液容量33%からA液容量0%/B液容量100% まで、B液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

溶出液を、1 mlずつフラクション番号をつけて分取し、各フラクション2 μ lを150 μ lの0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) /蒸留水と混合し凍結乾燥した。この乾燥物を後述の(2-5)に記した細胞内Caイオン濃度上昇活性測定用のアッセイ用サンプルとした。

5

(2-5) FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定

ZAQ安定発現細胞株は以下のようにして調製した。すなわち、参考例1で得たD H5 α /pCR2.1-ZAQCの1クローンを、アンピシリンを含むLB培地で振とう培養し、プラスミドpCR2.1-ZAQCを得た。これを制限酵素Sal IおよびSpe Iで処理し、
10 ZAQをコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素Sal IおよびSpe Iで処理したpAKK0-1.11Hと、該インサート部分をLigation Express Kit (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA, USA))を用いて連結し、大腸菌DH10Bにエレクトロポレーション法にて導入した。得られたクローンの有するプラスミドの構造を、制限酵素処理ならびに配列解析で確認し、正しい構築のものをCH
15 0細胞発現用プラスミドpAK-ZAQCとして使用した。

このプラスミドpAK-ZAQCをCHO/dhfr⁻細胞 (American Type Culture Collection) にCellPfect Transfection kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を用いて形質導入することにより取得した。まず、蒸留水120 μ lに溶解したプラスミドDNA 4 μ gに対してBuffer A (CellPfect Transfection Kitに添付) 120 μ lを
20 添加し、攪拌し、10分間静置後、Buffer B (CellPfect Transfection Kitに添付) 240 μ lを添加し、激しく攪拌し該DNAを含有するDNA-リン酸カルシウム複合体を形成させた。5 x 10⁵個のCHO/ dhfr⁻細胞を60 mmシャーレに播き、10%のウシ胎児血清 (BIO WHITTAKER 社) を含む Ham's F-12培地 (日水製薬株式会社) 中で37°C、5%炭酸ガス中で1日間培養した後、該DNA-リン酸カルシウム複体の懸濁液480 μ lをシャーレの該細胞上に滴下させた。これを、37°C、5
25 %炭酸ガス中にて6時間培養した後、血清を含まない Ham's F-12培地で2回細胞を洗浄し、シャーレの該細胞上に15%グリセロールを含む緩衝液(140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1.4 mM Na₂PO₄, pH7.1) 1.2mlを添加し2分間処理した。これを、再度、血清を含まないHam's F-12培地で2回洗浄した後、10%のウシ胎児血清

を含む Ham's F-12培地中で37°C、5%炭酸ガス中で一晚培養した。該細胞をトリプシン処理により分散させてシャーレから回収し、 2×10^4 個ずつ6-well plateに植え込み、透析済み10%ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社)、1 mM MEM非必須アミノ酸溶液 (大日本製薬株式会社)、100 units/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培地 (日水製薬株式会社) 中にて37°C、5%炭酸ガス中にて培養を開始した。プラスミドの導入された形質転換CHO細胞は該培地中で生育するが、非導入細胞は次第に死滅していくので、培養開始1日目、および2日目に培地を交換して死滅細胞を除去した。培養開始8-10日後に生育してきた形質転換CHO細胞のコロニーを約21個選んだ。それぞれ選択された細胞からRNAを市販のRNA単離用キットを用いて回収し、以降公知のRT-PCR法によりZAQを高発現するZAQ発現CHO細胞B-1番クローン(以後ZAQC-B1細胞と略称する)を選別した。

また、対照としてETA (エンドセリンAレセプター) 発現CHO細胞24番クローン (以後ETA24細胞と略称する。Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 279巻、675-685頁、1996年参照) を用いた。

上記(2-4)で得られたアッセイ用サンプルについて、ZAQC-B1細胞及びETA24細胞における細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定をFLIPR (Molecular Devices 社)を用いて行った。ZAQC-B1細胞、ETA24細胞共に10%透析処理済ウシ胎児血清 (以後d FBSとする)を加えたDMEMで継代培養しているものを用いた。ZAQC-B1細胞、ETA24細胞をそれぞれ 15×10^4 cells/mlとなるように培地(10% d FBS-DMEM)に懸濁し、FLIPR用96穴プレート (Black plate clear bottom、Coster社)に分注器を用いて各ウェルに200 μ lずつ植え込み(3.0×10^4 cells/200 μ l/ウェル)、5% CO₂インキュベーター中にて37°Cで一晩培養した後用いた (以後細胞プレートとする)。H/HBSS (ニッスイハックス2 (日水製薬株式会社) 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g、水酸化ナトリウム溶液で pH7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理) 20 ml、250 mM Probenecid 200 μ l、ウシ胎児血清 (FBS) 200 μ lを混合した。また、Fluo 3-AM (同仁化学研究所) 2パイアル(50 μ g)をジメチルスルフォキシド 40 μ l、20% Pluronic acid (Molecular Probes社) 40 μ lに溶解し、これを上記H/HBSS-Probenecid-FBSに加え、混和後、8連ピ

ペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μ l ずつ分注し、5 % CO₂ インキュベーター中にて 37°C で 1 時間 インキュベートした (色素ローディング)。上記 (2-4) で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションに、2.5 mM Probenecid、0.2% BSA を含む H/HBSS 150 μ l を加えて希釈し、FLI
5 PR 用 96 穴 プレート (V-Bottom プレート、Coster 社) へ移した (以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSS に 2.5 mM Probenecid を加えた洗浄バッファーでプレートウォッシャー (Molecular Devices 社) を用いて細胞プレートを 4 回洗浄し、洗浄後 100 μ l の洗浄バッファーを残した。
この細胞プレートとサンプルプレートを FLIPR にセットしアッセイを行った (FLIP
10 R により、サンプルプレートから 50 μ l のサンプルが細胞プレートへと移される)。
。

その結果、上記 (2-3) IV 液を上記 (2-4) 逆相高速液体クロマトグラフィー分離して得られたフラクション No. 53 に ZAQC-B1 細胞に特異的な細胞内 Ca イオン濃度上昇活性が見られた。

15

(2-6) TSKgel Super-Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製 (1)

TSKgel Super-Phenyl 逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm) を、40°C にて、流速 1 ml/min で A 液 (0.1% トリフル
20 オロ酢酸/蒸留水) 容量 81.7% / B 液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量 8.3% を流し平衡化した。上記 (3-4) で得られたフラクション No. 53 についてクロマトグラフィー操作を行った。即ち、フラクション No. 53 の溶液 1 ml を該カラムに添着した後、流速 1 ml/min で、1 分間かけて A 液容量 75% / B 液容量 25% まで上昇させ、次いで 75 分間かけて A 液容量 67% / B 液容量 33% まで、B 液濃度を直線的グラジエントで上昇させた。

25

溶出液を、500 μ l ずつフラクション No. をつけて分取した。分取フラクションより各 25 μ l ずつ 0.2% BSA 150 μ l と混合し凍結乾燥機 (12EL; VirTis 社) で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、0.2% BSA を含む H/HBSS 150 μ l を加えて溶解し、この溶液 50 μ l を用いて上記 (2-5) の試験法により、細胞内 Ca イオン濃度上昇活性を測定することにより、ZAQC-B1 細胞に対する

レセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、主としてフラクションNo. 103-105に溶出されていることが判明した。

5 (2-7) μ RPC C2/C18 ST 4.6/100逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

μ RPC C2/C18 ST 4.6/100逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (Amersham Pharmacia Biotech社、0.46 cm x 10 cm) を、40°Cにて、流速1 ml/minでA液 (ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水) 容量95%/B液 (0.1%ヘプタフルオロ酪酸/100%アセトニトリル) 容量5%を流し平衡化した。

10 上記(2-6)で得られたTSKgel Super-Phenyl逆相高速液体クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo. 103-105をそのまま μ RPC C2/C18 ST 4.6/100逆相カラムに添着した後、流速 1ml/minで 1分間で A液 (0.1% ヘプタフルオロ酪酸/蒸留水) 容量95%/B液 (0.1% ヘプタフルオロ酪酸/100% アセトニトリル) 容量5%からA液容量65%/B液容量35%まで急速に上昇させ、これを次に、流速1 ml/minで、60分間かけてA液容量50%/B液容量50% まで直線的グラジエントで上昇させ溶出液を回収した。溶出液は、210 nmの紫外吸収では単一なピークとして検出された。

20 溶出液を、500 μ lずつフラクション番号をつけて分取し、分取フラクションより各10 μ lづつを0.2% BSA 150 μ lと混合し凍結乾燥機 (12EL; VirTis社) で凍結乾燥させた。この乾燥物に、2.5 mM Probenecid、0.2% BSAを含むH/HBS S 150 μ lを加えて溶解し、この溶液50 μ lを用いて上記(3-5)の試験法により、ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。その結果、目的とするZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo. 82-84に溶出されていることが判明した。この活性ピークは、210 nmの紫外吸収ピークに完全に一致し、単一ペプチドにまで精製されたものと判断した。

(2-8) 精製されたZAQ活性化ペプチドの構造解析

上記(2-7)で得られたZAQ活性化成分について以下の方法で構造決定を実施した。ZAQ活性化成分精製標品中の溶媒を真空濃縮機(サーバント)を用いて除去し、得られた乾固物を溶媒DMSO(ジメチルサルフォキシド)に溶解した。この溶液の一部をプロテインシークエンサー(パーキンエルマー社、PE Biosystems P
 5 rocise 491cLC)を用いたN末端からのアミノ酸配列解析に供した。その結果、N末端のアミノ酸残基から16番目のアミノ酸残基のうち、14残基を同定することができた(Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly (配列番号: 6; Xaaは未同定残基))。

10 参考例3 ヒト型ZAQリガンドペプチドのcDNAのクローニング

参考例2で得られた牛乳から精製されたZAQを活性化するペプチドのN末端アミノ酸配列(配列番号: 6)をクエリーとしてデータベースをBlast検索したところ、配列番号: 6で表わされるアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNAの塩基配列と同等な配列を含むヒトEST(X40467)を見出した。本配列は完全長
 15 のオープンリーディング・フレームを有していなかったため、以下にRACE法により未確定部分の配列を明らかにし、引き続いて完全長のオープンリーディング・フレームを有すcDNAクローンを取得した。

EST(X40467)の情報よりプライマーZF1(配列番号: 7)、ZF2(配列番号: 8)とZF3(配列番号: 9)を作成し、ヒト精巢Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を
 20 鋳型として以下に記した3' RACE実験を実施した。

ZF1: 5'-GGTGCCACGCGAGTCTCAATCATGCTCC-3' (配列番号: 7)

ZF2: 5'-GGGGCCTGTGAGCGGGATGTCCAGTGTG-3' (配列番号: 8)

ZF3: 5'-CTTCTTCAGGAAACGCAAGCACCACACC-3' (配列番号: 9)

3' RACEのPCR反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l
 25 、添付の10 x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μ g/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μ l、dNTP mixture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μ l、10 μ MプライマーZF1を1 μ l、10 μ MプライマーAP1 (プライマーAP1はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型cDNA (CLONTECH社、ヒト精巢Marathon-Ready cD

NA) を5 μ l、及び蒸留水を33 μ lを混合して作製した。反応条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30秒-72°C・4分のサイクル反応を5回、94°C・30秒-70°C・4分のサイクル反応を5回、94°C・30秒-68°C・44分のサイクル反応を25回行った。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液は50
5 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l、添付の10 x Advantage 2
PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)₂, 37.5 μ g/ml
BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μ l、dNTP mixture (2.5 mM e
ach, 宝酒造)を4 μ l、10 μ MプライマーZF2を1 μ l、10 μ MプライマーAP2 (
プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの) を1 μ l
10 、鋳型DNA (該PCR反応液50倍希釈液) を5 μ l、及び蒸留水を33 μ lを混合して
作製した。反応条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30秒-72°C・4分のサイクル
反応を5回、94°C・30秒-70°C・4分のサイクル反応を5回、94°C・30秒-68°C・44分の
サイクル反応を25回行った。

さらに続いて、該PCR反応の反応液を鋳型として2回目のnested PCRを実施した
15 。反応液は50 x Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH社)を1 μ l、添付の10
x Advantage 2 PCR buffer (400 mM Tricine-KOH, 150 mM KOAc, 35 mM Mg(OAc)
2, 37.5 μ g/ml BSA, 0.05% Tween-20, 0.05% Nonidet-P40)を5 μ l、dNTP mix
ture (2.5 mM each, 宝酒造)を4 μ l、10 μ MプライマーZF3を1 μ l、10 μ Mプ
ライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付の
20 ものをを用いた。) を1 μ l、鋳型DNA (該PCR反応液50倍希釈液) を5 μ l、及び蒸
留水を33 μ lを混合して作製した。反応条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30
秒-72°C・4分のサイクル反応を5回、94°C・30秒-70°C・4分のサイクル反応を5回、9
4°C・30秒-68°C・44分のサイクル反応を25回行った。得られたDNA断片をTOPO TA C
loning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従っ
25 てクローニングした。クローニングされたDNAの塩基配列をABI377DNA sequencer
を用いて解読し、3' 端配列 (配列番号: 10) を得た。

配列番号: 10 で表わされる塩基配列及びEST (X40467) の情報によりプライマ
ーZAQL-CF (配列番号: 11) 及びZAQL-XR1 (配列番号: 12) を作成した。ヒト
精巢Marathon-Ready cDNA (CLONTECH社)を鋳型としてプライマーZAQL-CF とZAQ

L-XR1を用いてPCRを実施した。

ZAQL-CF: 5'-CCACCATGAGAGGTGCCACG-3' (配列番号: 11)

ZAQL-XR1: 5'-CTCGAGCTCAGGAAAAGGATGGTG-3' (配列番号: 12)

PCR反応液はPfuTurbo DNA polymerase(Stratagene社)を1 μ l、添付の10 x PCR bufferを5 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを4 μ l、10 μ MプライマーZAQL-CF及びZAQL-XR1を各2.5 μ l、鋳型DNAを5 μ l、及び蒸留水を30 μ lを混合して作製した。反応条件は95°C・1分の初期変性後、95°C・1分-60°C・1分-72°C・1分のサイクル反応を40回、および72°C・10分の最終伸長反応とした。得られたDNA断片をTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA断片の塩基配列をABI377DNA sequencerを用いて解読した結果、371bpの、それぞれ配列番号: 13および配列番号: 14で表わされる塩基配列を有していることが明らかとなった。配列番号: 13で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpHMITAと、配列番号: 14で表わされる塩基配列を有するDNA断片を有するプラスミドをpHMITGと命名した。

プラスミドpHMITA及びpHMITGにより大腸菌 (*Escherichia coli*) をトランスフォームさせ、それぞれエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pHMITAおよびエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pHMITGと命名した。

これらのDNA断片の塩基配列を解析した結果、配列番号: 13で表わされるDNA断片は、配列番号: 15で表わされるヒト型Z A Qリガンド前駆体ペプチド(Aタイプ、105アミノ酸残基)をコードするDNA (配列番号: 16) を含んでおり、配列番号: 14で表わされるDNA断片は、配列番号: 17で表わされるヒト型Z A Qリガンド前駆体ペプチド(Gタイプ、105アミノ酸残基)をコードするDNA (配列番号: 18) を含んでいることが明らかとなった。

また、配列番号: 16および配列番号: 17で表わされる塩基配列は典型的なシグナル配列を有しており、配列番号: 16で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号: 19で表わされるヒト型Z A Qリガンドペプチド(Aタイプ、86アミノ酸残基)をコードする258塩基対からなるDNA (配列番号: 20) を含んでおり、配列番号: 17で表わされる塩基配列を有するDNAは、配列番号: 21で表

わされるヒト型Z A Qリガンド成熟体ペプチド(Gタイプ、86アミノ酸残基)をコードする258塩基対からなるDNA(配列番号: 22)を含んでいることが明らかとなった。

5 参考例4 ヒト型ZAQリガンドペプチドの哺乳動物細胞での産生

(4-1) ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド哺乳動物細胞発現ベクターの構築

参考例3において取得したプラスミドpHMITGからEco RI、Xho I制限酵素消化によってヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチドをコードするcDNAを含む382bpのDNA断片(配列番号: 23)を切出した。

- 10 すなわち、プラスミドpHMITGをEco RIおよびXho Iで酵素消化し、得られたDNAを1.5 %アガロースゲルを用いて電気泳動し、サイバーグリーン染色される約382 bpのバンドを含むゲル片を剃刀で切り取った。該ゲル片より Gene Clean spin DNA 抽出キット (BIO 101社) を用いてDNA断片を回収した。得られたDNA断片をCMV-IEエンハンサーおよびchicken beta-actin promoterを発現プロモーターとする哺乳動物細胞発現ベクターpCAN618に対してEco RI、Xho I制限酵素切断部位に
- 15 定法に従ってクローニングした。クローニングされたDNA断片の塩基配列を前述の方法により解読した結果、配列番号: 23で表わされる塩基配列を有していることが確認された。このヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチドをコードするDNAを有する哺乳動物細胞発現ベクターをpCANZAQLg2と命名した。

20

(4-2) COS7細胞への発現ベクターの導入

COS7細胞はATCCより購入し、DMEM培地(10% FBSを加えたもの)を用いて継代培養しているものを用いた。DMEM培地を用いてCOS7細胞を 1.5×10^6 cells/dishとなるよう10cmシャーレにまき、37°C、5% CO₂インキュベーター中で一晚培養した。

25 ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現プラスミド(pCANZAQLg2) 2 μ g (2 μ lのTEバッファーに溶解) にバッファーEC (Effectene transfection reagent、QIAGEN) 298 μ lを加え、さらにEnhancer 16 μ lを加え、1秒間混和後室温で3分間放置した。さらにEffectene Transfection Reagent 60 μ lを加え、10秒間混和後室温で10分間放置した。前日にまいた細胞の上清を除き、DMEM培地 10 mlで1回

洗浄し、DMEM培地を9 mlを加えた。プラスミド溶液にDMEM培地1mlを加えて混和後細胞に滴下し、全体を混ぜた後37℃、5% CO₂インキュベーター中で一晚培養した。DMEM培地10 mlで2回洗浄し、DMEM培地 10mlを加え、37℃、5% CO₂インキュベーター中で一晚培養した。2日後、培養上清を回収した。

5

(4-3) ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清からのZAQを活性化するペプチドの部分精製

(4-3-1) ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清抽出液の調製

- 10 ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清を回収し、以下の操作を行い抽出液を調製した。まず、細胞培養上清(約18.5ml)に終濃度が1 Mになるように酢酸1.1 mlを滴下し、一時間攪拌した。さらにその2倍容量のアセトンを加え、4℃にて30分間攪拌し、次いで高速遠心機(CR26H、23型ローター:日立株式会社)を用いて15,000 rpm、30分間遠心し上清を得た。得られた上清をエ
- 15 バポレーターにかけ、アセトンを除去した後、凍結乾燥機(12EL; VirTis社)にて凍結乾燥した。

(4-3-2) ヒト型ZAQリガンド前駆体ペプチド発現COS7細胞培養上清のSephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィー及びSepPakカラムクロマトグラフィー

- 20 上記(4-3-1)で得られた凍結乾燥粉末を1M酢酸2mlに溶解後、1 M酢酸で平衡化したSephadex G15(直径3 cm、35ml、Pharmacia Biotech 社)カラムに吸着させた後、1 M酢酸をカラムに流し、溶出液を5 mlづつフラクションNo.をつけて分取し、凍結乾燥機(12EL; VirTis社)で凍結乾燥させた。

- 25 SepPak C18-5gカラム(10ml)を、メタノールにて膨潤後、0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水を流し、平衡化した。Sephadex G50ゲルろ過クロマトグラフィー分取フラクションのうちフラクションNo. 1-16の凍結乾燥品をまとめて0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水 3mlに溶解し、SepPak C18-5gカラムに添着した後、0.1%トリフルオロ酢酸/蒸留水 24mlで洗浄後、0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル20mlで溶出した。得られた溶出液をサーバントにかけた。

(4-3-3) Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィーによる精製

- TSKgel Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィー用カラム (東ソー株式会社、0.46 cm x 10 cm) を、40°Cにて、流速1 ml/minでA液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) を流し、平衡化した。(4-3-2) で得られたSepPak C18-5gカラムフラクションをサーバントにかけた後、Super ODS逆相高速液体クロマトグラフィーに添着し、流速 1ml/minで60分間で A液 (0.1% トリフルオロ酢酸/蒸留水) 容量100%/B液 (0.1% トリフルオロ酢酸/60% アセトニトリル) 容量0%からA液容量0%/B液容量100%まで直線的グラジエントで上昇させ、溶出液を回収した。

- 溶出液を、1 mlずつフラクションNo. をつけて分取し、分取フラクション全量を凍結乾燥機 (12EL; VirTis社) で凍結乾燥させた。この乾燥物にH/HBSSに2.5mM Probenecid、0.2% BSAを加えたもの150 μ lを加えて溶解し、この溶液を用いて下記 (4-3-4) の試験法により、ZAQC-B1細胞に対するレセプター活性化作用を測定した。

(4-3-4) ZAQリガンドの活性測定 (FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定)

- 上記 (4-3-3) で得られたサンプルについて、参考例2 (2-5) で得られたZAQ発現細胞 (ZAQC-B1) における細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定をFLIPRを用いて行った。また、対照としてhOT7T175発現細胞 (hOT7T175-16; WO 0/24890に記載) を用いた。

- ZAQC-B1細胞、hOT7T175-16細胞共に10%透析処理済ウシ胎児血清 (以後d FBSとする) を加えたDMEMで継代培養しているものを用いた。ZAQC-B1細胞、hOT7T175-16細胞をそれぞれ 15×10^4 cells/mlとなるように培地 (10% dFBS-DMEM) に懸濁し、FLIPR用96穴プレート (Black plate clear bottom, Coster社) に分注器を用いて各ウェルに200 μ lずつ播き (3.0×10^4 cells/200 μ l/ウェル)、5% CO₂インキュベーター中で37°Cで一晩培養した後、用いた (以後細胞プレートとする)。H/HBSS (HANKS' 9.8g、炭酸水素ナトリウム 0.35g、HEPES 4.77 g、水酸化ナトリウムで pH

- 7.4に合わせた後、フィルター滅菌処理)21ml、250mM Probenecid 210 μ l、ウシ胎児血清(FBS) 210 μ lを混合した。また、Fluo3-AM 2バイアル(50 μ g)をジメチルスルフォキシド 42 μ l、20% Pluronic acid 42 μ lに溶解し、これを上記H/H BSS-Probenecid-FBSに加え、混和後、8連ピペットを用いて培養液を除いた細胞プレートに各ウェル 100 μ lずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中で37°Cで1時間インキュベートした(色素ローディング)。上記(4-3-3)で得られたアッセイ用サンプルについて、各フラクションにH/HBSSに2.5mM Probenecid、0.2% BSAを加えたもの150 μ lを加えて溶解し、FLIPR用96穴プレート(V-Bottomプレート、Coster社)へ移した(以後、サンプルプレートとする)。細胞プレートの色素ローディング終了後、H/HBSSに2.5mM Probenecidを加えた洗浄バッファでプレートウォッシャー(Molecular Devices社)を用いて細胞プレートを4回洗浄し、洗浄後100 μ lの洗浄バッファを残した。この細胞プレートとサンプルプレートをFLIPRにセットし、アッセイを行った(FLIPRにより、サンプルプレートから0.05mlのサンプルが細胞プレートへと移される)。フラクションNo. 48-68にZAQ C-B1細胞特異的な細胞内Caイオン濃度上昇活性が見られた。このことから、目的とするZAQ C-B1細胞に対するレセプター活性化作用を有する成分、すなわち、ZAQ活性化成分は、フラクションNo. 48-68に溶出されていることが判明した。

実施例1 大腸菌でのヒトZAQリガンド(配列番号:21)の製造

20 実施例1-1 大腸菌でのヒトZAQリガンド発現プラスミドの構築

(a) 以下に示す6種のDNA断片#1~#6を用いて、ZAQリガンドの構造DNAを調製した。

#1:

5'-TATGCGGTGATTACCGGTGCGTGC GAACGTGATGTGCAGTGC GGTGCGGGTACCTGCTGCGCGATTAG

25 CCTGTGGCTGCGTGGTCTG-3' (配列番号:24)、

#2:

5'-CGTATGTGCACCCCGCTGGGTGCGTGAAGGTGAAGAATGCCATCCGGGTAGCCATAAAGTGCCGTTCTTC

CGTAAACGTAAACATCATACCTG-3' (配列番号:25)、

#3:

5' -CCCGTGCCTGCCGAACCTGCTGTGCAGCCGTTTCCCGGATGGTCGTTATCGTTGCAGCATGGATCTGAA
AAACATTAACCTTTTAGG-3' (配列番号: 26)、

#4:

5' -CACATACGCAGACCACGCAGCCACAGGCTAATCGCGCAGCAGGTACCCGCACCGCACTGCACATCACGT
5 TCGCACGCACCGGTAATCACCGCCA-3' (配列番号: 27)、

#5:

5' -AGGCACGGGCAGGTATGATGTTTACGTTTACGGAAGAACGGCACTTTATGGCTACCCGGATGGCATTCT
TCACCTTCACGACCCAGCGGGGTG-3' (配列番号: 28)、

#6:

10 5' -GATCCCTAAAAGTTAATGTTTTTCAGATCCATGCTGCAACGATAACGACCATCCGGGAAACGGCTGCAC
AGCAGGTTCCGC-3' (配列番号: 29)。

(b) DNAオリゴマーのリン酸化

5' 側になるべき上記#1および#6を除いた4種のDNAオリゴマー (#2
15 ~#5) 各々を、25 μ lのリン酸化反応液 [DNAオリゴマー10 μ g, 50mM Tris-HCl, pH7.6, 10mM MgCl₂, 1mMスベルミジン, 10mM ジチオスレイトール (以後DTTと略記), 0.1mg/mlウシ血清アルブミン (以後BSAと略記), 1mM ATP, 10ユニットT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造)] 中で37℃・1時間反応させ、各オリゴマーの5'末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

(c) DNAフラグメントの連結

上記(b)で得られたDNAフラグメントと上記#1および#6を合わせ、1
20 μ lとした。この混合液を90℃で10分間保持した後、室温まで徐冷しア
25 ニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2 (宝酒造) を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液30 μ lにキットに付属のII液30 μ lを加え、よく混合した後、キットに付属のI液60 μ lを加え、37℃・1時間反応させ、ライゲーションを行った。その後、フェノール処理を行ない、水層を回収して2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDN

Aを沈殿させた。この様にして得られたDNAフラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、以下の工程(d)に供した。

(d) ZAQリガンド発現ベクターの構築

発現用ベクターとしてはpTCII（特開2000-178297号に記載）をNdeI
5 およびBamHI（宝酒造）で37℃・2時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.3kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、25μlのTE緩衝液に溶解した。このpTCIIのNdeI、BamHI断片と上記により調製したZAQリガンドの構造遺伝子（配列番号：38）をTaKaRa DNA ligation kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を10μl用いて大腸菌JM109コンピテ
10 ントセル（東洋紡）を形質転換し、10μg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドpTCh1ZAQを調製した。このZAQリガ
15 ンドDNAの塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTCh1ZAQを大腸菌（*Escherichia coli*）MM294（DE3）に形質転換し、ZAQリガンド発現株*Escherichia coli* MM294(DE3)/pTCh1ZAQを得た。

20 実施例1-2 ZAQリガンドの製造

上記の*Escherichia coli* MM294(DE3)/pTCh1ZAQを5.0mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地・1L（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）を用いて2L容フラスコ中で37℃、8時間振とう培養した。得られた培養液を19Lの主発酵培地（1.68%リン酸1水素ナトリウム、0
25 .3%リン酸2水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第1鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%ハイケースアミノ）を仕込んだ50L容発酵槽へ移植して、30℃で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が500クレット単位になったところで、イソプロピルーβ-D

ーチオガラクトピラノシドの最終濃度が12mg/Lになるように添加し、さらに4時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約200gの湿菌体を取得し、-80℃で保存した。

この形質転換大腸菌MM294 (DE3) / pTCh1ZAQは、受託番号 I
5 FO 16527として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託されている。

実施例1-3 ZAQリガンドの活性化

実施例1-2で得られた菌体200gに、200mMトリス/HCl、7Mグ
アニジン塩酸塩 (pH8.0) 400mlを加えて菌体を溶解した後、遠心分離
10 (10000rpm、1時間)を行った。上澄液に0.4Mアルギニン、50m
Mトリス/HCl、0.2mM GSSG、1mM GSH (pH8.0) 10
リットルを加えて、4℃で一晩活性化を行った。

実施例1-4 ZAQリガンドの精製

15 実施例1-3で活性化の終了した再生液をpH6.0に調整し、50mMリン
酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したSP-セファロースカラム (11.3cm
×15cm) に吸着させた後、600mM NaCl/50mMリン酸緩衝液 (pH6.0) で溶出し、Z
AQリガンドを含むフラクションをプールした。この
画分を50mM リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化したCM-5PW (21.
20 5mm×150mmL) に通液し、吸着、洗浄した後、0-100%B (B=50m
M リン酸緩衝液+1M NaCl、pH6.05) の段階勾配 (60分) で溶出を
行いZ
AQリガンド画分 (溶出時間約40分) を得た。この画分を、さらに0.
1%トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50 (21.5mmID×300mmL
、昭和電工) に通液し、吸着、洗浄した後、25-50%B (B:80%アセト
25 ニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸) の段階勾配 (60分) で溶出を行い、Z
AQリガンド画分 (溶出時間約40分) をプールした後、凍結乾燥を行い、Z
AQリガンド凍結乾燥粉末約80mgを得た。

実施例1-5 ZAQリガンドの特徴決定

(a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例1-4で得られたZAQリガンドを100mM DTTを添加したSample buffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] に懸濁し、95℃で1分間加熱した後、マルチゲル15/25 (第一化学薬品) で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー (Coomassie brilliant blue) で染色した結果、参考例(4-3-3)で得られたCOS7細胞由来の組換え型ZAQリガンド標品と同じ位置に、単一の蛋白バンドが認められた。このことから、実施例1-4で得られた大腸菌由来の組換え型ZAQリガンド標品は極めて高純度であり、COS7細胞から調製した組換え型ZAQリガンドと分子量的に同一であることが分かった。

(b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計 (日立L-8500A Amino Acid Analyzer) を用いて決定した。その結果、ZAQリガンド (配列番号: 21で表されるアミノ酸配列からなるペプチド) のDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した (表1)。

表 1

	アミノ酸	1 モル当たりの	Z A Q リガンドの塩基配列
		残 基 数	から予測される値
5	A s x	5. 7	6
	T h r ¹⁾	3. 3	4
	S e r ¹⁾	3. 4	4
	G l x	5. 0	5
10	P r o	5. 6	6
	G l y	7. 7	8
	A l a	3. 9	4
	C y s ²⁾	N. D.	1 0
	V a l	2. 9	3
15	M e t	1. 9	2
	I l e	2. 6	3
	L e u	8	8
	T y r	1. 0	1
	P h e	3. 7	4
20	H i s	3. 8	4
	L y s	3. 8	4
	A r g	8. 5	9
	T r p	0. 9.	1

25 酸加水分解 (6 N H C l - 1 % フェノール、1 1 0 ° C、2 4 及び 4 8 時間加水分解の平均値)

1) 0 時間に外挿した値

2) 未検出

(c) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（PEアプライドバイオシステムズ モデル492）を用いて決定した。その結果、得られたZ A QリガンドのDNAの塩基配列から推定されたZ A QリガンドのN末端アミノ酸配列と一

5 致した（表2）。

表 2

残基 No.	検出された		ZAQリガンドの塩基配列
	PTH-アミノ酸 ¹⁾		から予測される
	(pmol)		アミノ酸
5	1	A l a (99)	A l a
	2	V a l (100)	V a l
	3	I l e (91)	I l e
	4	T h r (57)	T h r
10	5	G l y (70)	G l y
	6	A l a (89)	A l a
	7	N. D.	C y s
	8	G l u (60)	G l u
	9	A r g (49)	A r g
15	10	A s p (54)	A s p
	11	V a l (79)	V a l
	12	G l n (67)	G l n
	13	N. D.	C y s
	14	G l y (54)	G l y
20	15	A l a (65)	A l a
	16	G l y (47)	G l y
	17	T h r (32)	T h r
	18	N. D.	C y s
	19	N. D.	C y s
25	20	A l a (36)	A l a

1) フェニールチオヒダントイン150 pmolを用いて分析を行った。

N. D. は未検出を示す。

(d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。得られたZAQリガンドはDNAの塩基配列から推定されたC末端アミノ酸と一致した（表3）。

5

表3

	C末端アミノ酸	回収率 (%)

10	P h e	49.8

気相ヒドラジン分解法（100℃，3.5時間）

(e) 質量分析

- 15 質量分析をnanoESIイオン源を装着したLCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト社製）を用いて行った。その結果、分子量 9657.55 ± 0.89 が得られ、配列番号：21の、しかも配列番号：21が有する10残基のCysが5対のジスルフィド結合を形成したZAQリガンドの理論分子量（9657.3）と良く一致していた。

20

実施例1-6 ZAQリガンドの活性測定（FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定）

- 25 実施例1-4で得られた純化された大腸菌由来の組換え型ZAQリガンド標品を参考例（4-3-4）の方法を用いて、活性測定（FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定）を行った。その結果、参考例（4-3-3）で得られたCOS7細胞由来の組換え型標品（ZAQリガンドの精製品）と同等の活性を有していた。

実施例2 大腸菌でのヒトZAQリガンド（配列番号：30，ヒト型Bv8）の

製造

実施例 2-1 大腸菌でのヒト ZAQ リガンド (ヒト型 B v 8) 発現プラスミドの構築

- (a) 以下に示す 6 種の DNA 断片 # 1 ~ # 6 を用いて、ヒト型 B v 8 の構造遺伝子を調製した。

1 :

5' - TATGGCGGTGATTACCGGTGCGTGCGATAAAGATAGCCAGTGCGGTGGCGGTATGTGCTGTGCGGTGACATTTGGGTGAAA -3' (配列番号 : 3 2) 、

2 :

- 10 5' - AGCATTCGTATTTGCACCCCGATGGGCAAACTGGGCGATAGCTGCCATCCGCTGACCCGTAAAGTGCCGTTTTTTGGCCGCC -3' (配列番号 : 3 3) 、

3 :

5' - GTATGCATCATACCTGCCCCTGCCTGCCGGGCTGGCGTGCCTGCGCACCAGCTTTAACCGCTTTATTGCTGGCGCAGAAATAGG -3' (配列番号 : 3 4) 、

- 15 # 4 :

5' - CGAATGCTTTTCACCCAAATGCTCACCGCACAGCACATACGCCACCGCACTGGCTATCTTTATCGCACGCCGGTAATCACCGCCA -3' (配列番号 : 3 5) 、

5 :

- 20 5' - ATGATGCATACGGCGGCCAAAAACGGCACTTTACGGGTGCGCGGATGGCAGCTATCGCCCAGTTTGC CCATCGGGGTGCAAATA -3' (配列番号 : 3 6) 、

6 :

5' - GATCCCTATTTCTGCGCCAGGCAAATAAAGCGTTAAAGCTGGTGCGCAGGCACGCCAGGCCCGGCAGGCACGGGCAGGT -3' (配列番号 : 3 7) 。

- 25 (b) DNA オリゴマーのリン酸化

5' 側になるべき上記 # 1 および # 6 を除いた 4 種の DNA オリゴマー (# 2 ~ # 5) 各々を、25 μ l のリン酸化反応液 [DNA オリゴマー 10 μ g, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM スペルミジン, 10 mM ジチオスレイトール (以後 DTT と略記), 0.1 mg/ml ウシ血清アルブ

ミン（以後BSAと略記），1 mM ATP，10ユニットT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）中で37℃・1時間反応させ、各オリゴマーの5'末端をリン酸化した。フェノール処理を行った後、2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。

5 (c) DNAフラグメントの連結

上記(b)で得られたDNAフラグメントと上記#1および#6を合わせ、120 μ lとした。この混合液を90℃で10分間保持した後、室温まで徐冷しアニーリングを行った後、TaKaRa DNA Ligation Kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。アニーリング液30 μ lにキットに付属のII液30 μ lを加え、よく混合した後、キットに付属のI液60 μ lを加え、37℃・1時間反応させ、ライゲーションを行った。その後、フェノール処理を行ない、水層を回収して2倍量のエタノールを加え、-70℃に冷却した後、遠心でDNAを沈殿させた。この様にして得られたDNAフラグメントをT4ポリヌクレオチドキナーゼ（宝酒造）によるリン酸化を行った後、以下の工程(d)に供した。

15 (d) ヒト型Bv8発現ベクターの構築

発現用ベクターとしてはpTCII（特開2000-178297号公報に記載）をNdeIおよびBamHI（宝酒造）で37℃・2時間消化した後、1%アガロースゲル電気泳動により4.3 kbのDNA断片をQIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社）を用いて抽出し、25 μ lのTE緩衝液に溶解した。このpTCIIのNdeI、BamHI断片と上記により調製したヒト型Bv8の構造遺伝子（配列番号：39）をTaKaRa DNA ligation kit ver.2（宝酒造）を用いてライゲーション反応を行った。この反応液を10 μ l用いて大腸菌JM109コンピテントセル（東洋紡）を形質転換し、10 μ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天培地上に播き、37℃で1晩培養し、生じたテトラサイクリン耐性コロニーを選んだ。この形質転換体をLB培地で一晩培養し、QIAprep8 Miniprep Kit（キアゲン社）を用いてプラスミドpTCh2ZAQを調製した。このヒト型Bv8 DNAの塩基配列をアプライドバイオシステムズ社モデル377 DNAシーケンサーを用いて確認した。プラスミドpTCh2ZAQを大腸菌（Escherichia coli）MM294（DE3）に形質転換し、ヒト型Bv8発現株Escherichia coli

MM294(DE3)/ pTCh2ZQAを得た。

実施例 2-2 ヒト型 B v 8 の製造

上記の *Escherichia coli* MM294(DE3)/ pTCh2ZQA を 5.0 mg/L のテトラサイクリンを含む LB 培地・1 L (1% ペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) を用いて 2 L 容フラスコ中で 37℃、8 時間振とう培養した。得られた培養液を 19 L の主発酵培地 (1.68% リン酸 1 水素ナトリウム、0.3% リン酸 2 水素カリウム、0.1% 塩化アンモニウム、0.05% 塩化ナトリウム、0.05% 硫酸マグネシウム、0.02% 消泡剤、0.00025% 硫酸第 1 鉄、0.0005% 塩酸チアミン、1.5% ブドウ糖、1.5% ハイケースアミノ) を仕込んだ 50 L 容発酵槽へ移植して、30℃ で通気攪拌を開始した。培養液の濁度が 500 クレット単位になったところで、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドの最終濃度が 12 mg/L になるように添加し、さらに 4 時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、約 500 g の湿菌体
5
10
15

実施例 2-3 ヒト型 B v 8 の活性化

実施例 2-2 で得られた菌体 400 g に、200 mM トリス/HCl、7 M グアニジン塩酸塩 (pH 8.0) 800 ml を加えて菌体を溶解した後、遠心分離 (10000 rpm、1 時間) を行った。上澄液に 0.4 M アルギニン、50 mM トリス/HCl、0.2 mM GSSG、1 mM GSH (pH 8.0) 20 リットルを加えて、4℃で一晩活性化を行った。
20

実施例 2-4 ヒト型 B v 8 の精製

実施例 2-3 で活性化の終了した再生液を pH 6.0 に調整し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した SP-セファロースカラム (11.3 cm × 15 cm) に吸着させた後、600 mM NaCl/50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で溶出し、ヒト型 B v 8 を含むフラクションをプールした。この画分を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化した SP-5PW (21.
25

5 mm×150 mm L)に通液し、吸着、洗浄した後、0-100%B (B=50 mM リン酸緩衝液+1 M NaCl、pH 6.05)の段階勾配(60分)で溶出を行いヒト型B v 8画分(溶出時間約40分)を得た。この画分を、さらに0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したC4P-50 (21.5 mm ID×300 mm L、昭和電工)に通液し、吸着、洗浄した後、25-50%B (B:80%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸)の段階勾配(60分)で溶出を行い、ヒト型B v 8画分(溶出時間約30分)をプールした後、凍結乾燥を行い、ヒト型B v 8凍結乾燥粉末約25 mgを得た。

10 実施例2-5 ヒト型B v 8の特徴決定

(a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例2-4で得られたヒト型B v 8を100 mM DTTを添加したSample buffer [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)]に懸濁し、95℃で1分間加熱した後、マルチゲル15/25 (第一化学薬品)で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー (Coomassie brilliant blue)で染色した結果、9 kDaの位置に単一の蛋白バンドが認められた。このことから、実施例2-4で得られた大腸菌由来の組換え型ヒト型B v 8の標品は極めて高純度であることが分かった。

(b) アミノ酸組成分析

20 アミノ酸組成をアミノ酸分析計(日立L-8500A Amino Acid Analyzer)を用いて決定した。その結果、ヒト型B v 8(配列番号:30で表されるアミノ酸配列からなるペプチド)のDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した(表4)。

表 4

	アミノ酸	1 モル当たりの	ヒト型 B v 8 の塩基配列
		残 基 数	から予測される値
5	A s x	4. 0	4
	T h r ¹⁾	4. 6	5
	S e r ¹⁾	4. 3	5
	G l x	2. 3	2
10	P r o	5. 2	5
	G l y	7. 8	8
	A l a	5. 0	5
	C y s ²⁾	N. D.	10
	V a l	3. 8	4
15	M e t	2. 8	3
	I l e	4. 2	5
	L e u	6	6
	T y r	0	0
	P h e	3. 7	4
20	H i s	2. 9	3
	L y s	4. 9	5
	A r g	5. 8	6
	T r p	0. 9.	1

25 酸加水分解 (6 N HCl - 4% チオグリコール酸、110℃、24 及び 48 時間加水分解の平均値)

1) 0 時間に外挿した値

2) 未検出

(c) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（P Eアプライドバイオシステムズ モデル492）を用いて決定した。その結果、得られたヒト型B v 8のDNAの塩基配列から推定されたヒト型B v 8のN末端アミノ酸配列と一致し

5 た（表5）。

表 5

残基 No.	検出された PTH-アミノ酸 ¹⁾ (pmol)	ヒト型B v 8の塩基配列 から予測される アミノ酸
5	1	A l a (103)
	2	V a l (99)
	3	I l e (88)
	4	T h r (54)
10	5	G l y (66)
	6	A l a (79)
	7	N. D.
	8	A s p (47)
	9	L y s (62)
15	10	A s p (50)
	11	S e r (36)
	12	G l n (52)
	13	N. D.
	14	G l y (44)
20	15	G l y (55)
	16	G l y (56)
	17	M e t (50)
	18	N. D.
	19	N. D.
25	20	A l a (33)

1) PTH (フェニールチオヒダントイン) 誘導体として検出した。ヒト型B v 8を150 pmol用いて分析を行った。

N. D. は未検出を示す。

(d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（日立L-8500A Amino Acid Analyzer）を用いて決定した。得られたヒト型Bv8はDNAの塩基配列から推定され
 5 たC末端アミノ酸と一致した（表6）。

表6

C末端アミノ酸	回収率 (%)

10 L y s	18.9

気相ヒドラジン分解法（100℃，3.5時間）

15 (e) 質量分析

質量分析をnanoESIイオン源を装着したLCQイオントラップ質量分析計（サーモクエスト社製）を用いて行った。その結果、分子量8792.8±0.5が得られ、配列番号：30の、しかも配列番号：30が有する10残基のCysが5対のジスルフィド結合を形成したヒト型Bv8の理論分子量(8792.5)と
 20 良く一致していた。

実施例2-6 ヒト型Bv8の活性測定（FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定）

実施例2-4で得られた純化された大腸菌由来の組換え型ヒト型Bv8標品を
 25 参考例（4-3-4）の方法を用いて、活性測定（FLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度上昇活性の測定）を行った。その結果、CHO細胞由来の組換え型標品（ヒト型Bv8の精製品）と同等の活性を有していた。

産業上の利用の可能性

本発明の製造法は、従来の製造法に比べ、薬理的に活性なZ A Qリガンドを工業的に大量にかつ効率的に製造するために有用である。

請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすること
5 を特徴とする配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有する活性型のペプチドまたはその塩の製造方法。
2. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：21で
15 表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である請求項1記載の製造方法。
3. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：21で
20 表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である請求項1記載の製造方法。
4. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：19で
25 表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である請求項1記載の製造方法。
5. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：30で
表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペ

プチドまたはその塩である請求項1記載の製造方法。

6. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩が、配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩である請求項1記載の製造方法。

7. 配列番号：21または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型の該ペプチドまたはその塩の製造方法。

8. 配列番号：21、配列番号：19または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、レドックスバッファー中でリフォールディングすることを特徴とする活性型のペプチドまたはその塩の製造方法。

9. レドックスバッファーが還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを含有する緩衝液である請求項1記載の製造方法。

10. レドックスバッファー中の還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの濃度が、それぞれ約0.01～100ミリモル/リットルである請求項9記載の製造方法。

11. 緩衝液がトリス緩衝液である請求項8記載の製造方法。

12. レドックスバッファーのpHが7から9の範囲である請求項1記載の製造方法。

13. レドックスバッファーのpHが約8である請求項1記載の製造方法。

14. レドックスバッファーが、メルカプト基を有さないアミノ酸を、さらに含有する請求項1記載の製造方法。

15. メルカプト基を有さないアミノ酸がアルギニンである請求項14記載の製造方法。

16. メルカプト基を有さないアミノ酸のレドックスバッファー中の濃度が約0.1～1モル/リットルである請求項14記載の製造方法。

17. 0～30℃下でリフォールディングする請求項1記載の製造方法。
18. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を可溶化し、ついでレドックスバッファー中でリフォールディングする請求項1記載の製造方法。
- 5 19. 配列番号：21または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を可溶化し、ついでレドックスバッファー中でリフォールディングする請求項7記載の製造方法。
- 10 20. 還元剤非存在下で可溶化する請求項18または請求項19記載の製造方法。
21. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質またはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を変性剤で可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸をさらに含有するpH7～9のレドックスバッファーで、変性剤を不作用濃度まで希釈することを特徴とする請求項1記載の製造方法。
- 15 22. 配列番号：21または配列番号：30で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、該細胞を変性剤で可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸をさらに含有するpH7～9のレドックスバッファーで、変性剤を不作用濃度まで希釈することを特徴とする請求項7記載の製造方法。
- 20 23. 変性剤がグアニジンまたは尿素である請求項21または請求項22記載の製造方法。
- 25 24. 希釈液中の変性剤の濃度が、約0～2モル／リットルになるまで、レドックスバッファーで希釈する請求項21または請求項22記載の製造方法。
25. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩と結合する、または該タンパク質ま

たはその塩を活性化する能力を有するペプチドまたはその塩を遺伝子工学的に原核細胞宿主中で発現させ、形成された封入体に存在する該ペプチドまたはその塩を、レドックスバッファー中でリフォールディングする請求項 1 記載の製造方法。

- 5 26. ペプチドが、配列番号：21 または配列番号：30 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドである請求項 25 記載の製造方法。

27. 配列番号：21 または配列番号：30 で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するペプチドを遺伝子工学的に発現させた原核細胞宿主を、変性剤で可溶化し、ついでメルカプト基を有さないアミノ酸、還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを含有する緩衝液と反応させる活性型の該ペプチドまたはその塩の製造方法。
- 10

1/24

[SEQUENCE LISTING]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method of Producing ZAQ ligand

<130> P01-0292PCT

<150> JP 2001-13027

<151> 2001-01-22

<150> JP 2001-147759

<151> 2001-05-17

<160> 41

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Glu Thr Thr Met Gly Phe Met Asp Asp Asn Ala Thr Asn Thr Ser

5

10

15

Thr Ser Phe Leu Ser Val Leu Asn Pro His Gly Ala His Ala Thr Ser

20

25

30

Phe Pro Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Asp Tyr Asp Met Pro Leu Asp Glu

35

40

45

2/24

Asp Glu Asp Val Thr Asn Ser Arg Thr Phe Phe Ala Ala Lys Ile Val
 50 55 60
 Ile Gly Met Ala Leu Val Gly Ile Met Leu Val Cys Gly Ile Gly Asn
 65 70 75 80
 Phe Ile Phe Ile Ala Ala Leu Val Arg Tyr Lys Lys Leu Arg Asn Leu
 85 90 95
 Thr Asn Leu Leu Ile Ala Asn Leu Ala Ile Ser Asp Phe Leu Val Ala
 100 105 110
 Ile Val Cys Cys Pro Phe Glu Met Asp Tyr Tyr Val Val Arg Gln Leu
 115 120 125
 Ser Trp Glu His Gly His Val Leu Cys Thr Ser Val Asn Tyr Leu Arg
 130 135 140
 Thr Val Ser Leu Tyr Val Ser Thr Asn Ala Leu Leu Ala Ile Ala Ile
 145 150 155 160
 Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Pro Leu Arg Pro Arg Met Lys Cys
 165 170 175
 Gln Thr Ala Thr Gly Leu Ile Ala Leu Val Trp Thr Val Ser Ile Leu
 180 185 190
 Ile Ala Ile Pro Ser Ala Tyr Phe Thr Thr Glu Thr Val Leu Val Ile
 195 200 205
 Val Lys Ser Gln Glu Lys Ile Phe Cys Gly Gln Ile Trp Pro Val Asp
 210 215 220
 Gln Gln Leu Tyr Tyr Lys Ser Tyr Phe Leu Phe Ile Phe Gly Ile Glu
 225 230 235 240
 Phe Val Gly Pro Val Val Thr Met Thr Leu Cys Tyr Ala Arg Ile Ser
 245 250 255
 Arg Glu Leu Trp Phe Lys Ala Val Pro Gly Phe Gln Thr Glu Gln Ile

3/24

260	265	270
Arg Lys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Lys Thr Val Leu Val Leu Met Cys		
275	280	285
Ile Leu Thr Ala Tyr Val Leu Cys Trp Ala Pro Phe Tyr Gly Phe Thr		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Phe Phe Pro Thr Val Phe Val Lys Glu Lys His Tyr		
305	310	315
Leu Thr Ala Phe Tyr Ile Val Glu Cys Ile Ala Met Ser Asn Ser Met		
325	330	335
Ile Asn Thr Leu Cys Phe Val Thr Val Lys Asn Asp Thr Val Lys Tyr		
340	345	350
Phe Lys Lys Ile Met Leu Leu His Trp Lys Ala Ser Tyr Asn Gly Gly		
355	360	365
Lys Ser Ser Ala Asp Leu Asp Leu Lys Thr Ile Gly Met Pro Ala Thr		
370	375	380
Glu Glu Val Asp Cys Ile Arg Leu Lys		
385	390	

<210> 2

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atggagacca ccatgggggtt catggatgac aatgccacca acattccac cagcttcctt	60
tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttccttcc cattcaactt cagctacagc	120
gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gtcttttgc	180

4/24

gccaaagattg tcattgggat ggccctgggtg ggcatcatgc tggctgcgg cattggaaac 240
 ttcatcttta tcgtgccctt ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
 atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gtggccattg tctgctgcc ctttgagatg 360
 gactactatg tggtgcgcca gctctccctg gagcacggcc acgtccctg cacctctgtc 420
 aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg cctgctggc catcgccatt 480
 gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtcca aacagccact 540
 ggcttgattg ccttgggtg gacgggtgcc atctgatcg ccatccctc cgcctacttc 600
 accaccgaga cggtcctcgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttcg cggccagatc 660
 tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tcttacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
 ttctgtggcc cctgtgtcac catgacctg tgctatgcca ggatctccg ggagctctgg 780
 ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctgcg ctgccgcagg 840
 aagacgggtc tggtgctcat gtgcatctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
 tacggcttca ccatcgtgcg cgacttctc cccaccgtgt tctgaagga gaagcactac 960
 ctactgcct tctacatcgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
 tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gtgtctccac 1080
 tgaaggctt cttaaatgg cgttaagtcc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
 atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcac agactaaaa 1179

<210> 3

<211> 1179

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

atggagacca ccatggggtt catggatgac aatgccacca acattccac cagcttcctt 60
 tctgtgctca accctcatgg agcccatgcc acttcttcc cattcaactt cagctacagc 120
 gactatgata tgcctttgga tgaagatgag gatgtgacca attccaggac gttctttgct 180

5/24

gccaagattg tcattgggat ggccctgggtg ggcatcatgc tggctcgcgg cattggaaac 240
ttcatcttta tcgtcgccct ggtccgctac aagaaactgc gcaacctcac caacctgctc 300
atcgccaacc tggccatctc tgacttcctg gttggccattg tctgctgccc ctttgagatg 360
gactactatg tggcgcgcca gctctcctgg gagcacggcc acgtcctgtg cacctctgtc 420
aactacctgc gcactgtctc tctctatgtc tccaccaatg ccctgtggc catcgccatt 480
gacaggtatc tggctattgt ccatccgctg agaccacgga tgaagtcca aacagccact 540
ggcctgattg ctttgggtgtg gacgggtgtc atcctgatcg ccatcccttc cgcctacttc 600
accaccgaga cggctcctgt cattgtcaag agccaggaaa agatcttctg cggccagatc 660
tggcctgtgg accagcagct ctactacaag tctacttcc tctttatctt tggcatagaa 720
ttcgtgggcc ccgtggtcac catgaccctg tgctatgcca ggatctccg ggagctctgg 780
ttcaaggcgg tccctggatt ccagacagag cagatccgca agaggctcgc ctgccgcagg 840
aagacggctc tggcgtcat gtgcatcctc accgcctacg tgctatgctg ggcgcccttc 900
tacggcttca ccatcgtgcg cgacttcttc cccaccgtgt ttgtgaagga gaagcactac 960
ctcactgcct tctacatcgt cgagtgcac gccatgagca acagcatgat caacactctg 1020
tgcttcgtga ccgtcaagaa cgacaccgtc aagtacttca aaaagatcat gtgctccac 1080
tggaaggctt cttacaatgg cggtaagtc agtgcagacc tggacctcaa gacaattggg 1140
atgcctgcca ccgaagaggt ggactgcac agactaaaa 1179

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

6/24

gtcgacatgg agaccacat ggggttcacg g 31

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

actagtttat tttagtctga tgcagtcac ctcctc 36

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Bovine

<400> 6

Ala Val Ile Thr Gly Ala Xaa Glu Arg Asp Val Gln Xaa Arg Ala Gly

5

10

15

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

7/24

<223> Primer

<400> 7

ggtgccacgc gagtctcaat catgctcc

28

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

ggggcctgtg agcgggatgt ccagtgtg

28

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

cttcttcagg aaacgcaagc accacacc

28

8/24

<210> 10

<211> 409

<212> DNA

<213> Human

<400> 10

cttcttcagg aaacgcaagc accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgctccag 60
gttcccgagc ggcaggtacc gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct 120
tgcttggtct caggatacc accatccttt tcctgagcac agcctggatt tttatttctg 180
ccatgaaacc cagctcccat gactctccca gtcctacac tgactaccct gatctctctt 240
gtctagtacg cacatatgca cacaggcaga catactccc atcatgacat ggtccccagg 300
ctggcctgag gatgtcacag ctgaggctg tggigtgaaa ggtggccagc ctggttctct 360
tccttgctca ggctgccaga gaggtggtaa atggcagaaa ggacattcc 409

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

ccaccatgag aggtgccacg

20

<210> 12

<211> 24

9/24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

ctcgagctca ggaaaaggat ggtg

24

<210> 13

<211> 371

<212> DNA

<213> Human

<400> 13

ccaccatgag aggtgccacg cgagtcctca tcatgctcct cctagtaact gtgtctgact 60
gtgtctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgctgtg 120
ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
agtgccaccc cggcagccac aagatcccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
cttgcttgcc caacctgctg tgctccaggt tcccggacgg caggtaccgc tgctccatgg 300
acttgaagaa catcaatttt taggcgcttg cctggctcct ggataccac catccttttc 360
ctgagctcga g 371

<210> 14

<211> 371

<212> DNA

<213> Human

10/24

<400> 14

```
ccaccatgag aggtgccacg cgagtcctca tcatgtctct cctagtaact gtgtctgact 60
gtgtctgtgat cacaggggcc tgtgagcggg atgtccagtg tggggcaggc acctgtctgt 120
ccatcagcct gtggcttcga gggctgcgga tgtgcacccc gctggggcgg gaaggcgagg 180
agtgccaccc cggcagccac aaggctccct tcttcaggaa acgcaagcac cacacctgtc 240
cttgcttgcc caacctgtctg tgctccaggt tcccgacgg caggtagcgc tgctccatgg 300
acttgaagaa catcaatctt taggcgcttg cctgggtctca ggataccac catccttttc 360
ctgagctcga g 371
```

<210> 15

<211> 105

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met	Arg	Gly	Ala	Thr	Arg	Val	Ser	Ile	Met	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Val
				5					10					15	
Ser	Asp	Cys	Ala	Val	Ile	Thr	Gly	Ala	Cys	Glu	Arg	Asp	Val	Gln	Cys
			20					25					30		
Gly	Ala	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Ile	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg
			35				40					45			
Met	Cys	Thr	Pro	Leu	Gly	Arg	Glu	Gly	Glu	Glu	Cys	His	Pro	Gly	Ser
			50			55					60				
His	Lys	Ile	Pro	Phe	Phe	Arg	Lys	Arg	Lys	His	His	Thr	Cys	Pro	Cys
			65			70				75					80
Leu	Pro	Asn	Leu	Leu	Cys	Ser	Arg	Phe	Pro	Asp	Gly	Arg	Tyr	Arg	Cys
				85					90						95

11/24

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe

100

105

<210> 16

<211> 315

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

atgagaggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctctcctag taactgtgtc tgactgtgct 60
 gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
 agcctgtggc ttcgagggtt gcggatgtgc acccgcctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
 caccgccgca gccacaagat ccccttcctc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
 ttgcccgaacc tgctgtgtc caggttcccg gacggcaggt accgtgtctc catggacttg 300
 aagaacatca atttt 315

<210> 17

<211> 105

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

Met Arg Gly Ala Thr Arg Val Ser Ile Met Leu Leu Leu Val Thr Val
 5 10 15
 Ser Asp Cys Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys
 20 25 30
 Gly Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg
 35 40 45

12/24

Met Cys Thr Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser

50

55

60

His Lys Val Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys

65

70

75

80

Leu Pro Asn Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys

85

90

95

Ser Met Asp Leu Lys Asn Ile Asn Phe

100

105

<210> 18

<211> 315

<212> DNA

<213> Human

<400> 18

atgagagggtg ccacgcgagt ctcaatcatg ctcttcctag taactgtgtc tgactgtgct 60
 gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg ctgtgccatc 120
 agcctgtggc ttcgagggtc gcggatgtgc accccgctgg ggcgggaagg cgaggagtgc 180
 caccgccgca gccacaaggt ccccttcttc aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc 240
 ttgcccaacc tgcgtgtctc caggttcccg gacggcaggt accgtgtctc catggacttg 300
 aagaacatca atttt 315

<210> 19

<211> 86

<212> PRT

<213> Human

13/24

<400> 19

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly

5

10

15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr

20

25

30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Ile

35

40

45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn

50

55

60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp

65

70

75

80

Leu Lys Asn Ile Asn Phe

85

<210> 20

<211> 258

<212> DNA

<213> Human

<400> 20

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60

atcagcctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcacccgc tggggcggga aggcgaggag 120

tgccaccccg gcagccacaa gatcccttc ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180

tgcttgccca acctgtgtg ctccaggttc cggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240

ttgaagaaca tcaatttt

258

<210> 21

14/24

<211> 86

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Glu Arg Asp Val Gln Cys Gly Ala Gly

5

10

15

Thr Cys Cys Ala Ile Ser Leu Trp Leu Arg Gly Leu Arg Met Cys Thr

20

25

30

Pro Leu Gly Arg Glu Gly Glu Glu Cys His Pro Gly Ser His Lys Val

35

40

45

Pro Phe Phe Arg Lys Arg Lys His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Asn

50

55

60

Leu Leu Cys Ser Arg Phe Pro Asp Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Met Asp

65

70

75

80

Leu Lys Asn Ile Asn Phe

85

<210> 22

<211> 258

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

gctgtgatca caggggcctg tgagcgggat gtccagtgtg gggcaggcac ctgctgtgcc 60

atcagccctgt ggcttcgagg gctgcggatg tgcaccccg tggggcggga aggcgaggag 120

tgccaccccg gcagccacaa ggtcccttc ttcaggaaac gcaagcacca cacctgtcct 180

15/24

tgcttgccca acctgctgtg ctccaggttc cggacggca ggtaccgctg ctccatggac 240
ttgaagaaca tcaatttt 258

<210> 23

<211> 382

<212> DNA

<213> Human

<400> 23

gaattcgccc ttccaccatg agaggtgcc a cgcgagtctc aatcatgctc ctccctagtaa 60
ctgtgtctga ctgtgctgtg atcacagggg cctgtgagcg ggatgtccag tgtggggcag 120
gcacctgctg tgccatcagc ctgiggcttc gagggctgcg gatgtgcacc ccgctggggc 180
gggaaggcga ggagtgccac cccggcagcc acaaggtccc cttcttcagg aaacgcaagc 240
accacacctg tccttgcttg cccaacctgc tgtgctccag gttcccggac ggcaggtacc 300
gctgctccat ggacttgaag aacatcaatt tttaggcgct tgcctggict caggataccc 360
accatccttt cctgagctcg ag 382

<210> 24

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

tatggcggtg attaccggtg cgtgcgaacg tgatgtgcag tgcggtcggg gtacctgctg 60

16/24

cgcgattagc ctgtggctgc gtggtctg

88

<210> 25

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

cgtatgtgca ccccgctggg tcgtgaaggt gaagaatgcc atccgggtag ccataaagtg 60

ccgttcttcc gtaaacgtaa acatcatacc tg 92

<210> 26

<211> 86

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

cccgtgcctg ccgaacctgc tgtgcagccg tttcccggat ggtcgttatc gttgcagcat 60

ggatctgaaa aacattaact tttagg 86

<210> 27

17/24

<211> 94

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

cacatacgca gaccacgcag ccacaggcta atcgcgagc aggtacccgc accgcactgc 60
acatcacgtt cgcacgcacc ggtaatcacc gccca 94

<210> 28

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

aggcacgggc aggtatgatg ttacgttta cggaagaacg gcactttatg gctacccgga 60
tggcattctt caccttcacg acccagcggg gtg 93

<210> 29

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

18/24

<220>

<223> Primer

<400> 29

gatccctaaa agttaatggt tttcagatcc atgctgcaac gataacgacc atccgggaaa 60
 cggctgcaca gcaggttcgg c 81

<210> 30

<211> 81

<212> PRT

<213> Human

<400> 30

Ala Val Ile Thr Gly Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly
 5 10 15
 Met Cys Cys Ala Val Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr
 20 25 30
 Pro Met Gly Lys Leu Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val
 35 40 45
 Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly
 50 55 60
 Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln
 65 70 75 80
 Lys

<210> 31

<211> 243

19/24

<212> DNA

<213> Human

<400> 31

```
gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac tcccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct   60
gtcagtatct gggccaagag cataaggatt tgcacaccta tgggcaaact gggagacagc  120
tgccatccac tgactcgtaa agttccatit tttgggcgga ggatgcatca cacttgccca  180
tgtctgccag gcttggcctg ttiacggact tcatttaacc gatttatttg tttagcccaa  240
aag                                                                    243
```

<210> 32

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

```
tatggcgggtg attaccgggtg cgtgcgataa agatagccag tgcgggtggcg gtatgtgctg   60
tgcggtgagc atttgggtga aa                                                82
```

<210> 33

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20/24

<220>

<223> Primer

<400> 33

agcattcgta ttgcacccc gatgggcaaa ctgggcgata gctgccaatcc gctgaccgt 60
aaagtgccgt tttttggccg cc 82

<210> 34

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

gatatcatca tacctgcccg tgccctgccgg gcctggcgtg cctgcgcacc agctttaacc 60
gctttatttg cctggcgcag aaatagg 87

<210> 35

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

21/24

<400> 35

cgaatgcttt tcacccaaat gctcaccgca cagcacatac cgccaccgca ctggctatct 60
ttatcgcacg caccggtaat caccgcca 88

<210> 36

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

atgatgcata cggcggccaa aaaacggcac ttacgggtc agcggatggc agctatcgcc 60
cagtttgccc atcgggggtgc aaata 85

<210> 37

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

gatccctatt tctgcgccag gcaaataaag cggttaaagc tggcgcgag gcacgccagg 60
cccggcaggc acgggcagg 80

22/24

<210> 38

<211> 258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 38

```
gcggtagatta ccggtgcgtg cgaacgtgat gtgcagtgcg gtgcgggtac ctgctgcgcg   60
attagcctgt ggctgcgtgg tctgcgtatg tgcaccccg c tgggtcgtga aggtgaagaa  120
tgccatccgg gtagccataa agtgccgttc ttccgtaaac gtaaacaatca tacctgcccg  180
tgccatccga acctgctgtg cagccgtttc ccgcatggtc gttatcgttg cagcatggat  240
ctgaaaaaca ttaacttt                                     258
```

<210> 39

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 39

```
gcggtagatta ccggtgcgtg cgataaagat agccagtgcg gtggcggtat gtgctgtgcg   60
gtgagcattt gggtagaaag cattcgtatt tgcaccccg tgggcaaact gggcgatagc  120
```

23/24

tgccatccgc tgaccgtaa agtgccgttt ttggccgcc gtatgcatca tacctgcccg 180
 tgcctgccgg gcctggcgtg cctgcgcacc agctttaacc gctttatttg cctggcgcag 240
 aaa 243

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213> Human

<400> 40

Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro

5

10

15

Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly

20

25

30

Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val

35

40

45

Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu

50

55

60

Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg

65

70

75

80

Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg

85

90

95

Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys

100

105

<210> 41

<211> 324

<212> DNA

<213> Human

<400> 41

```
atgaggagcc tgtgctgcgc ccactcctg ctctctttgc tgcgcccgc gctgctgctc 60
acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgac accggggctt gtgacaagga ctcccaatgt 120
ggtggaggca tgtgctgtgc tgcagtatc tgggtcaaga gcataaggat ttgcacacct 180
atgggcaaac tgggagacag ctgcatcca ctgactcgt aagttccatt ttttgggcgg 240
aggatgcatc acacttgccc atgtctgcca ggcttggcct gtttacggac ttcatttaac 300
cgatttattt gtttagccca aaag                                     324
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00378

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5453363 A (Boehringer Mannheim GmbH), 26 September, 1995 (26.09.1995) & DE 3537708 A & EP 219874 A & EP 253823 A & EP 393725 A & WO 87/02673 A & PT 83609 A & ZA 8608012 A & AU 8665993 A & AU 8941321 A & HU 043643 T & JP 62-502895 A & JP 4-218387 A & DK 8703203 A & FI 8702753 A & FI 9303868 A & DD 260517 A & SU 1607689 A & ES 2020498 A & IL 80325 A & CA 1329157 C & IE 62634 B & US 5593865 A & CZ 8607526 A3 & CZ 9400460 A3 & SK 8607526 A3	1-27
Y	JP 10-191989 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 28 July, 1998 (28.07.1998) (Family: none)	1-27
Y	WO 00/53753 A2 (GENENTECH, INC.), 14 September, 2000 (14.09.2000) & AU 200026008 A	1-4, 7-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 February, 2002 (21.02.02)Date of mailing of the international search report
05 March, 2002 (05.03.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00378

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/52022 A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.), 08 September, 2000 (08.09.2000) & AU 200033868 A	1-4, 7-27
Y	WO 00/70049 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 23 November, 2000 (23.11.2000) & AU 200051511 A	1-4, 7-27
Y	Christain Wechselberger et al., The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes, FEBS Letters, 1999, Vol.462, p.177-181	1, 5-27
A	WO 00/34334 A1 (SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION), 15 June, 2000 (15.06.2000) & AU 200021723 A & EP 1147136 A1	1-27
PY/PA	WO 01/16309 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 08 March, 2001 (08.03.2001) & AU 200067280 A	1-4, 7-27/5-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 5453363 A (Boehringer Mannheim GmbH) 1995.09.26 & DE 3537708 A & EP 219874 A & EP 253823 A & EP 393725 A & WO 87/02673 A & PT 83609 A & ZA 8608012 A & AU 8665993 A & AU 8941321 A & HU 043643 T & JP 62-502895 A & JP 4-218387 A & DK 8703203 A & FI 8702753 A & FI 9303868 A & DD 260517 A & SU 1607689 A & ES 2020498 A & IL 80325 A & CA 1329157 C & IE 62634 B & US 5593865 A & CZ 8607526 A3 & CZ 9400460 A3 & SK 8607526 A3	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.02.02

国際調査報告の発送日

05.03.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明照

4B 2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 10-191989 A (武田薬品工業株式会社) 1998. 07. 28 (ファミリーなし)	1-27
Y	WO 00/53753 A2 (GENENTECH, INC.) 2000. 09. 14 & AU 200026008 A	1-4, 7-27
Y	WO 00/52022 A1 (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.) 2000. 09. 08 & AU 200033868 A	1-4, 7-27
Y	WO 00/70049 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 2000. 11. 23 & AU 200051511 A	1-4, 7-27
Y	Christain Wechselberger et al., The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes, FEBS Letters, 1999, Vol. 462, p. 177-181	1, 5-27
A	WO 00/34334 A1 (SYNAPTIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 2000. 06. 15 & AU 200021723 A & EP 1147136 A1	1-27
PY/PA	WO 01/16309 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2001. 03. 08 & AU 200067280 A	1-4, 7-27/5-6